

FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

Année 1939

THÈSE

3^e Série - N^o 39

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

Mention " PHARMACIE "

PAR

Gilles GUYADER

Né à Lambézellec le 29 Août 1911



Recherches sur les Défécations Ferrocyano-Zinciques



Président : M. DOURIS

Juges : MM. KAYSER
RICHARD

B R E S T

Imprimerie Commerciale et Administrative, 17, Rue d'Algésiras

1 9 3 9

FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

Année 1939

THÈSE

3^e Série - N° 39

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

Mention " PHARMACIE "

PAR

Gilles GUYADER

Né à Lambézellec le 29 Août 1911



**Recherches
sur les Défécations
Ferrocyano-Zinciques**



Président : M. DOURIS
Juges : MM. KAYSER
RICHARD

B R E S T
Imprimerie Commerciale et Administrative, 17, Rue d'Algésiras

1 9 3 9

PERSONNEL ENSEIGNANT

Doyen :

M. F. KAYSER

Assesseur :

M. A. MEUNIER

Doyens honoraires :

M. BRUNTZ, C , , I , O , , .

Recteur de l'Université de Nancy.

M. SEYOT, , , I , , , Professeur d'Histoire naturelle.

Professeurs honoraires :

M. GRÉLOT, , I , .

M. BRUNTZ, C , , I , O , , .

Professeurs :

MM. DOURIS, I  ,  , 	Toxicologie.
PASTUREAU, O  , I  , 	Pharmacie chimique.
SEYOT,  ,  , I  ,  , 	Histoire naturelle.
LASSEUR,  , I  , 	Microbiologie.
MEUNIER	Pharmacie galénique.
Mlle M.-Th. FRANÇOIS	Matière médicale.
M. KAYSER	Chimie.

Maitre de Conférences :

M. MARCHAL Sciences naturelles.

Agrégé libre :

M. GIRARDET, , I  Chimie et Toxicologie.

Chargés de cours :

M. SEYOT,  ,  , I  ,  ,  , Pr	Cryptogamie.
Mlle M.-Th. FRANÇOIS, professeur	Hygiène.
MM. KAYSER, professeur	Chimie minérale.
DONZELOT,  , Pr Fac. Sciences	Physique.
SIMONNET, I  , Pr Fac. Droit	Déontologie.
MARCHAL, maître de conférences	Hydrologie.
VERNIER, I 	Zoologie.
CORDEBARD,  ,  , I 	Analyse chimique.
STEIMETZ, 	Minéralogie.
RICHARD	Chimie organique.

Chefs de travaux :

MM. VERNIER, I 	Microbiologie et Parasitologie.
CORDEBARD,  ,  , I 	Chimie et Analyse chimique.
STEIMETZ, 	Micrographie.
DONZELOT,  , (chargé de trav.)	Physique.
RICHARD (chargé de travaux)	Pharmacie.
BAILLY (chargé de travaux)	Chimie biologique et Toxicologie.

Secrétariat :

M. TRIBOLET, I  Secrétaire.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.



A la mémoire de mon Grand-Père

Le Docteur CHARLES GUYADER

A la mémoire de mon Oncle

Le Docteur PAUL GUYADER
Ancien Interne des Hôpitaux de Paris
Chevalier de la Légion d'honneur
Croix de guerre

A mon Père

Le Docteur JOSEPH GUYADER
Chevalier de la Légion d'honneur
Croix de guerre

A ma Mère

A mon Frère

Le Docteur CHARLES GUYADER
Médecin de 1^{re} Classe de la Marine

A mes Frères

A mes Belles-Sœurs

A l'inspirateur de notre Thèse

Monsieur le Professeur PAGET
de la Faculté Libre
de Médecine et de Pharmacie de Lille

A notre Président de Thèse

Monsieur le Professeur DOURIS
de la Faculté de Nancy
Membre correspondant de l'Académie de Médecine

A Messieurs les Professeurs, Membres du Jury

A nos Maîtres

A mes Amis

INTRODUCTION

LA DEFECATION DES LIQUIDES BIOLOGIQUES

La défécation des liquides biologiques est l'opération qui a pour objet l'élimination des substances colloïdales en pseudo-solution pouvant se rencontrer dans ces liquides. Elle conduit nécessairement à une solution vraie puisqu'elle élimine la « dispersion micellaire ».

Lorsqu'il s'agit de doser des substances minérales fixes, c'est-à-dire non volatiles, on peut détruire les colloïdes par calcination ou en mettant en œuvre un puissant agent d'oxydation tel que le mélange d'acide sulfurique et d'acide nitrique.

Lorsque les substances à doser sont de nature organique ou constituées par des corps minéraux volatils, comme le sont souvent les chlorures ou les sels ammoniacaux, il convient de séparer les substances colloïdales par des moyens moins énergiques. L'agent de défécation varie suivant la nature du dosage. Pour le dosage des sucres réducteurs, SCHENCK a proposé l'acide chlorhydrique à 2 % et le bichlorure de mercure à 5 % ; PATEIN et DUFAU (1) le nitrate mercurique ; RONA et MICHAELIS l'hydrate de fer colloïdal ; HAGEDORN et JANSEN (2) l'hydrate de zinc. DUMAZERT (3) préconise la défécation mercuro-cadmique, HARI une simple agitation avec le kaolin. Pour le dosage des chlorures, LAUDAT (4) utilise le permanganate de potassium. Pour le dosage de l'urée, de l'acide urique, MOOG (5) utilise l'acide trichloracétique à 20 %, FOLIN (6)

l'acide tungstique, BENEDIKT, l'acide molybdique. Dans le dosage de l'azote dit polypeptidique, CRISTOL (7) emploie l'acide trichloracétique et l'acide phosphotungstique après avoir utilisé l'acide trichloracétique et l'acide métaphosphorique (8).

Pour certains liquides comme l'urine, le lait, les jus végétaux, on emploie la chaux, les sels de plomb, soit l'acétate basique, soit l'acétate neutre.

Nos recherches, qui sont la continuation de celles du Professeur PAGET et de Mlle DUPONT (9) ont été poursuivies en vue de trouver un déféquant d'emploi fidèle et simple pouvant s'adapter au dosage du plus grand nombre des constituants des divers liquides biologiques. Sur le conseil de notre maître, le Professeur PAGET, qui s'était déjà vivement intéressé au problème, notre choix s'est porté sur un colloïde suspensoïde préparé au sein du liquide par additions successives et en proportions variables de solutions de ferrocyanure de potassium et de sulfate ou d'acétate de zinc.

Avant de développer les résultats de nos travaux, il nous paraît opportun de préciser les facteurs qui règlent l'équilibre colloïdal et d'indiquer les procédés utilisés jusqu'ici pour en provoquer la rupture.

Les facteurs qui règlent l'équilibre colloïdal sont :

- 1° La viscosité ;
- 2° La tension superficielle au contact du liquide ;
- 3° La charge électrique du colloïde.

C'est ce dernier facteur qui est prépondérant puisqu'il suffit que cette charge descende au-dessous d'une certaine valeur dite « potentiel critique » pour que les micelles s'agglomèrent et que la floculation se produise.

L'étude du signe électrique des colloïdes n'est pas diffi-

cile à réaliser. Il suffit d'établir un champ électrique dans un système colloïdal pour observer le sens suivi par le colloïde. Le micelle négatif ira à l'anode. Le micelle positif à la cathode.

La coexistence dans un même liquide de particules porteuses de charges de signes contraires n'est pas paradoxale. Elle s'explique aisément en admettant l'existence d'un complexe redissous dans un excès de colloïde d'un seul signe. Une comparaison aisée peut en être donnée. Les sels de cuivre précipitent par une dose très faible d'ammoniaque. Le précipité se redissout dans un excès de réactif précipitant.

La présence de protéines complique un peu le problème. LOEB [THOMAS (10)] a montré que ces substances se comportaient comme des électrolytes amphotères, c'est-à-dire comme des substances formant des sels aussi bien avec les acides (chlorhydrate de protéine par exemple) qu'avec les bases (protéinate de soude). Elles peuvent donc être électronégatives et électropositives. Le signe de leur charge dépend du pH du milieu. Une valeur du pH est cependant remarquable. C'est celle qui correspond au point isoélectrique de la protéine. Ce point constitue un point de stabilité minima et se rapporte à une zone de floculation.

Ces notions physico-chimiques vont nous permettre de préciser les diverses méthodes utilisées pour réaliser la floculation, la précipitation des particules micellaires. Il est classique de les ramener à trois types :

1. A pH constant, faire varier la quantité d'électrolytes (sublimé, aluns, sulfates de zinc, de cuivre...).
2. A pH constant, ajouter des doses variables, soit de

colloïde hydrophobe ou suspensoïde, soit de colloïde hydrophile ou émulsionnaire.

3. Modifier le pH par addition d'acides (acide trichloracétique, réactif d'Esbach, acide tungstique, acétique, phosphomolybdique).

La méthode de M. PAGET et de Mlle DUPONT ne rentre dans aucun de ces trois groupes. Nous montrerons en effet que son principe relève à la fois du premier et du second groupe. Nous préciserons, en outre, un mode opératoire qui dérivera au contraire du second et du troisième type. L'emploi de l'une ou de l'autre technique sera d'ailleurs imposé par la nature du dosage qui devra être pratiqué.

Notre thèse comprendra cinq chapitres au cours desquels nous envisagerons successivement la défécation ferrocyanozincique, la défécation du sang, celle du liquide céphalo-rachidien, des liquides gastriques et duodénaux, des exsudats et transsudats, la défécation du lait et la défécation de l'urine.

Avant d'aborder l'exposé de notre mémoire, nous sommes heureux de remercier le Professeur PAGET qui nous a inspiré ce travail et en a dirigé l'élaboration.

Nous remercions M. le Professeur DOURIS d'avoir accepté de présider le jury de notre thèse.

CHAPITRE PREMIER

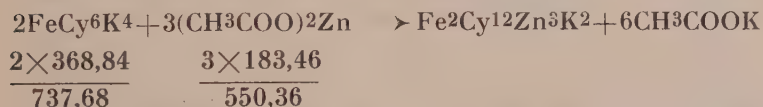
LA DEFECATION FERROCYANO-ZINCIQUE SELON LA TECHNIQUE DE MM. PACET, Y. DUPONT ET G. GUYADER

Les solutions utilisées sont préparées respectivement à partir du ferrocyanure de potassium et de l'acétate de zinc. Les sels employés doivent être anhydres et purs.

D'après de KONINCK et Eugène PROST, le composé qui se forme dans l'action du ferrocyanure sur l'acétate ne possède une formule constante qu'en présence d'un excès de ferrocyanure, et répond alors au schéma $\text{Fe}_2\text{Cy}_{12}\text{Zn}_3\text{K}_2$.

Dans les cas où les quantités de sels mises en présence sont telles que la double décomposition étant complète, aucun excès de l'un ou de l'autre des deux réactifs ne se trouve en solution, les propriétés du ferrocyanure double ainsi obtenu sont-elles les mêmes ?

Sa formation est liée à la réaction suivante :



Deux solutions renfermant sous un même volume, l'une 737 gr. 68 de ferrocyanure anhydre, l'autre 550 gr. 38 d'acétate anhydre, mélangées à volumes égaux fourniront donc un précipité qui devra renfermer la totalité du ferro-

cyanure de potassium et du zinc. Le liquide provenant de la filtration devra être exempt de chacune de ces substances et donner seulement la réaction de l'acétate de potassium.

C'est ce que nous avons vérifié en mélangeant les deux solutions suivantes :

Solution A :

Ferrocyanure de potassium pur anhydre .. 150 gr.
Eau distillée neutre Q.S.P. 1.000 cc.

Solution B :

Acétate de zinc pur anhydre 111 gr. 91
Eau distillée Q.S.P. 1.000 cc.

Si à 10 cc. d'eau distillée, on ajoute 10 cc. de solution A, puis, après avoir agité, 10 cc. de solution B, le tout agité fortement, fournit après filtration un liquide limpide ne renfermant absolument que l'acétate de potassium. La double décomposition est donc complète et conforme à la réaction ci-dessus.

Le ferrocyanure chimiquement pur cristallise avec 3 H₂O, l'acétate également. Si la composition du ferrocyanure est assez fixe, il n'en est souvent pas de même de l'acétate. Aussi, est-il préférable de s'adresser aux sels anhydres.

Pour cela, le ferrocyanure pur et l'acétate pur préalablement pulvérisés, sont abandonnés à l'étude à 105-110° jusqu'à poids constant (24 h.). A cette température, la composition de chacune de ces deux substances n'est nullement modifiée.

Pour faciliter la conservation de la solution d'acétate on peut y ajouter 5 cc. d'acide acétique. Le mélange à volumes égaux produit extemporanément du ferrocyanure

double de potassium et de zinc au sein du liquide et ne laisse en solution aucun excès de zinc.

Le ferrocyanure double constitue un colloïde suspensoïde.

DEFECATION A pH CONSTANT

Lors de nos premiers essais, nous nous sommes appliqués à trouver les doses de réactif susceptibles par double décomposition de réaliser une défécation parfaite du sérum et du plasma sanguin. Tous nos essais furent négatifs, et la conclusion de nos recherches peut se traduire ainsi :

« A pH constant, il est impossible de déprotéïniser sérum, plasma, sang total, par additions successives de volumes égaux de solutions A et B ».

Une déprotéïnisation partielle est cependant obtenue. C'est ce que nous avons pu vérifier au cours de dosages diaphanométriques. Ce résultat nous a alors incités à rechercher l'action complémentaire de divers électrolytes habituellement utilisés en pratique colloïdologique.

L'acétate de zinc s'était, tout d'abord, révélé, l'électrolyte fournissant les résultats apparemment les plus favorables et les plus réguliers. Le fait mérite d'être souligné. L'un des corps réagissant dans la réaction aboutissant au sel double est capable de compléter l'action floculante amorcée par le complexe auquel il a donné naissance. Il lui suffit d'être employé en léger excès. L'explication du phénomène ne semble pas difficile : les colloïdes hydrophiles du sérum, du plasma, du sang total, préalablement hémolysé, forment avec le colloïde suspensoïde primitif, un complexe à stabilité plus faible que celle du colloïde

émulsoïde primitif, mais encore suffisante pour s'opposer à une déprotéinisation parfaite après filtration. L'électrolyte « acétate de zinc » vient compléter la précipitation.

Deux questions pouvaient être posées *a priori*. L'action adjuvante est-elle due à l'anion acétique ou au cation zincique ? L'emploi de sulfate de zinc, par exemple, à des doses renfermant la proportion de cation zincique active sous forme d'acétate nous a semblé aboutir à des résultats aussi probants. La déprotéinisation est totale, le précipité a le même aspect macroscopique.

Aussi avons-nous établi une troisième solution que nous appellerons solution C et qui, eu égard à la stabilité du sulfate de zinc cristallisé, peut être obtenue par dissolution de 175 grs de SO_4Zn , $7\text{H}_2\text{O}$ dans un volume d'eau suffisant pour obtenir 1.000 cc.

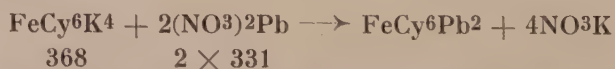
Solution C :

Sulfate de zinc à $7\text{H}_2\text{O}$ 175 gr.
Eau distillée neutre Q.S.P. 1.000 cc.

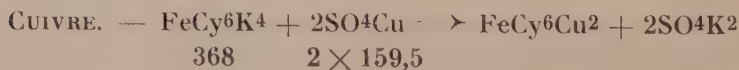
L'emploi de divers cations nous a amenés à faire les constatations suivantes

ARGENT. — Les sels d'argent employés en quantités proportionnelles précipitent les chlorures. La déprotéinisation est incomplète ; en milieu acide, il y a réduction du sel d'argent, le filtrat est brunâtre.

PLOMB.

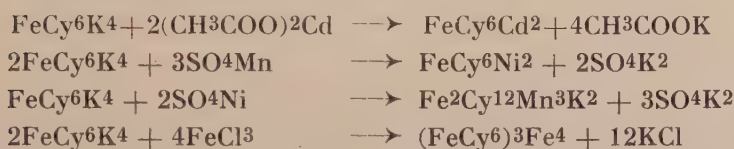


Avec une solution de nitrate de plomb à 269 0/00 la déprotéinisation est très faible.



Solution de SO_4Cu à 130 0/00 ou SO_4Cu , $5\text{H}_2\text{O}$ à 203,06 0/00, le ferrocyanure de cuivre produit une dépro-
téination totale. Les chlorures passent intégralement. Il
est vraisemblable que les glucides ne sont pas absorbés,
mais leur dosage iodométrique direct par le « Baudoin »
est impossible. L'addition d'iodomercurate provoque, en
effet, la formation d'iodure cuivreux avec le cuivre en
excès du filtrat et une libération d'iode d'autant plus
forte qu'il y a pléthore de cuivre. D'où erreur par défaut.
Pour que ce dosage ne soit pas erroné, il faudrait, au
préalable, éliminer l'excès de cuivre, par H_2S par exemple.

En considérant les réactions suivantes :



et en opérant avec des solutions correspondantes de cad-
mium, manganèse, nickel, fer maximum, aucune dépro-
téinisation n'a été observée.

Notre seconde conclusion sera donc :

« La défécation parfaite à pH constant du plasma, du
sérum, du sang total préalablement hémolysé est possible
par l'emploi des solutions A et B. Une condition est néces-
saire : un excès de la solution d'acétate de zinc. »

L'action de l'acétate est imputable à sa nature électro-
lytique. Il peut être remplacé par le sulfate. Le zinc se
révèle le cation fournissant les résultats les plus réguliers
et d'emploi le plus général.

DEFECATION A pH NETTEMENT ABAISSE

Si l'emploi à volumes égaux de solutions A et B aboutit

à un résultat négatif lorsque l'essai de défécation est tenté à pH constant, il n'en est plus de même lorsqu'on abaisse le pH par addition d'acide. Dans ce cas, on peut obtenir des résultats aussi intéressants que précédemment.

La nature de l'acidité semble peu importer. Elle peut être aussi bien acétique que sulfurique. La filtration est rapide. Le liquide ne renferme plus de protéines. Aucun excès d'acétate de zinc n'est présent dans le filtrat qui peut se prêter au dosage de certains composés organiques non protéiniques.

CONCLUSION

A *pH constant*, la défécation du sérum, du plasma, du sang total est impossible par additions successives de volumes égaux de solutions de ferrocyanure de potassium à 150 grs de sels anhydre 0/00 et d'acétate de zinc à 112 grs de sel anhydre 0/00. Elle devient très aisée à pH abaissé par addition d'acide.

A *pH constant*, la défécation des liquides précédents peut être parfaite par l'emploi de solutions de ferrocyanure et d'acétate. Une condition est nécessaire : un excès de la solution d'acétate de zinc. Cette action adjuvante n'est pas due seulement à la nature électrolytique de l'acétate, mais encore et surtout à une propriété spécifique du cation zinc.

Les filtrats obtenus sont totalement déprotéinisés.

Nous allons envisager dans les chapitres suivants l'application de ces solutions à la défécation des principaux liquides biologiques et étudier le dosage de leurs principaux constituants.

CHAPITRE DEUXIEME

LA DEFECATION DU SANG

(Sang total, plasma ou sérum, globules rouges)

Le sang est le véhicule des éléments nutritifs, des déchets de l'organisme. Abandonné à l'air, il se prend en gelée. Le caillot se rétracte et laisse exsuder le sérum, liquide transparent jaunâtre.

Le sérum et le plasma sont des solutions vraies. Ce sont également des solutions colloïdales. Le sang total, qui est aussi une solution vraie et une solution colloïdale, peut en outre, être considéré comme une émulsion. Cette phase n'existe cependant plus après hémolyse.

Le plasma renferme des composés minéraux et organiques. Les chlorures sont abondamment représentés. Normalement 1.000 cc. de plasma renferment 3 gr. 50 à 3 gr. 65 de Cl. Le taux moyen de NaCl est 5 gr. 85 ou 3 gr. 55 de Cl. Le sérum a pratiquement la même teneur. A l'étude du Cl plasmatique on associe la chlorémie globulaire. Les globules rouges renferment moitié moins de chlorures que le plasma. Il suffira que les globules rouges soient légèrement lysés pour que le Cl s'en échappe. Le Cl globulaire et le Cl plasmatique peuvent subir des variations. On détermine le rapport chloré érythro-plasmatique. Il oscille à l'état normal, entre 0,48 et 0,52.

On rencontre dans le sang des combinaisons minérales et organiques du phosphore : ortho et pyrophosphates, lipides phosphorés complexes, nucléoprotides et acides glycérophosphoriques. Au point de vue analytique, on distingue le P minéral et le P organique. Pour le sang total de l'homme sain : $P \text{ total} = 358 \text{ mg.}$ (oscillant entre 332 et 382).

Il existe du soufre de constitution, du soufre des protides et du soufre circulant qui, chez un sujet à jeun, varie entre 0,6 et 0,7 par litre. Le rapport sulfatémique est le rapport du soufre oxydé au soufre total.

Les hématies renfermeraient plus de Mg que de Ca. Le sérum en renfermerait moins.

Le plasma sanguin renferme la sérumalbumine, la sérumglobuline et le fibrinogène. Le sérum sanguin contient de la sérumalbumine et de la sérumglobuline accompagnées d'une substance précipitable par l'acide acétique, la fibrineglobuline. La protéinémie est d'environ 90 gr. par litre. Elle demeure généralement fixe. La sérumalbumine varie entre 38 et 45 et la globuline entre 28 et 35. La valeur de ce rapport est très importante. Les variations résultent des variations du sang en eau.

Le glucose existe dans le sang et la glycémie varie entre 0 gr. 80 et 1 gr. 20 par litre.

Le cholestérol existe dans le sérum et les globules rouges sous forme libre et éthérifiée.

Le composé azoté le plus important est l'urée. Normalement il existe dans le sang à la dose de 0 gr. 20 à 0 gr. 50. Le coefficient azotémique : $N \text{ uréique}/N \text{ total non protéinique} \times 100$, oscille entre 75-80.

Le sérum et les globules rouges n'ont pas la même teneur en acide urique : 0,04 à 0,05 par litre dans le

sérum ; 0,18 à 0,25 0/00 dans les globules rouges ; 0,10 à 0,15 0/00 dans le sang total.

La guanidine est un poison très toxique, musculaire : 10 à 20 mg. 0/00.

Le sérum renferme de l'indoxyle.

La polypeptidémie est variable d'un individu à l'autre.

DEFECATION DE CHACUNE DE CES PHASES EN FONCTION DES CONSTITUANTS QUI DOIVENT Y ETRE DOSES

I. — Action du déféquant sur quelques constituants minéraux

DOSAGE DE L'ANION CHLORE DANS LE SANG TOTAL, LE PLASMA, LE SÉRUM, LES GLOBULES ROUGES

Le réactif ferrocyanozincique laisse passer intégralement les chlorures dans le filtrat. L'étude des chiffres obtenus le montrera un peu plus loin. Auparavant, nous allons préciser ainsi que l'a montré M. le Professeur PAGET (12) pour ce dosage, l'importance du prélèvement, de la quantité et surtout de la nature de l'anticoagulant utilisé.

Ses travaux ont abouti aux conclusions suivantes : l'oxalate de sodium et le citrate de sodium sont des anticoagulants qui ne doivent plus être employés en vue de

l'étude du rapport chloré érythroplasmatique. En effet, le RCl varie en raison inverse de la concentration oxalatee employée. L'erreur par défaut est donc fonction directe de la quantité d'oxalate de soude utilisée. Le R Cl varie en raison directe de la concentration citratée. L'erreur est donc ici fonction directe de la quantité de citrate de soude utilisée.

L'utilisation de ces deux anticoagulants entraîne donc la pesée exacte de la quantité utilisée et la mesure exacte de la quantité de sang prélevée.

L'anticoagulant idéal serait l'hirudine. En raison de son prix élevé, il peut être remplacé par le polyanétholsulfonate de sodium étant donné son prix relativement modéré, son emploi à concentration très faible et surtout ses propriétés le rapprochant des anticoagulants du type anti-ferments.

La séparation des globules sera effectuée par centrifugation à 4.000-5.000 tours-minute jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de variations de volume.

Après lecture des volumes respectifs plasmatique et globulaire, on procède à la décantation du sérum, par exemple à l'aide du siphon d'Ambard et on parfait l'élimination du liquide surnageant à l'aide de papier filtre. Pour prélever les globules, pipetter dans la partie moyenne de la purée globulaire pour éviter d'entraîner du plasma ou de l'oxalate de calcium.

Le dosage du chlore peut se faire par la méthode de CHARPENTIER après minéralisation nitro-permanganique à chaud, selon la méthode de LAUDAT, technique de Max LÉVY (13) ou désalbumination à froid selon celle de M. le Professeur PAGET (14).

Voici la technique nitro-permanganique : dans une

fiolle conique de 200 cc. environ, mesurer 5 cc. de sérum, 10 cc. de NO^3Ag N/10, 6 cc. de MnO^4K à 6 % et 10 cc. de NO^3H pur. Porter à l'ébullition que l'on maintient jusqu'à ce que le liquide soit devenu sensiblement incolore. Ajouter environ 50 cc. d'eau distillée et refroidir le tout sous un courant d'eau. Verser alors dans la fiolle 5 cc. environ de la solution d'alun de fer à 5 % et laisser tomber dans la liqueur CNSK N/10 jusqu'à teinte rosée. Soit n le nombre de cc. employés :

Chlorures en NaCl 0/00 = $(10 - n) 0,0058 \times 200$

La technique au réactif ferrocyanozincique présente l'avantage de se faire à froid, la filtration ne demandant aucun contrôle, tandis qu'il faut continuellement surveiller l'ébullition dans la technique de Laudat, les débordements étant toujours à craindre, surtout dans le cas des globules.

a) DÉFÉCATION DU PLASMA. — Etendre Ncc. de plasma à 25 N avec de l'eau distillée (dans nos essais $N = 4$). Agiter, ajouter successivement en mélangeant bien après chaque addition N/4 de ferrocyanure et N/2 d'acétate. Compléter à 50 N. Filtrer.

b) DÉFÉCATION DE LA PURÉE GLOBULAIRE. — Prélever minutieusement V cc. de purée globulaire ($V = 3$ est généralement facile à obtenir en partant d'un volume de sang initial de 10 à 12 cc. qui correspond aux prélèvements habituels). Etendre à 75. Après hémolyse déféquer avec 0,6 V de ferrocyanure et 1,2 V d'acétate. Compléter à 250 ($V = 3$) ou à 75 V. Agiter. Filtrer.

Dosage :

a) *Cas du plasma.* — Dans le cas de $N = 4$, prélever 150 cc. de filtrat limpide obtenu, ajouter 5 cc. NO^3H pur,

5 cc. NO_3Ag N/10 et 2 cc. d'une solution saturée d'alun de fer ammoniacal. Agiter énergiquement pour caillerbotter le précipité de AgCl . Laisser reposer une ou deux minutes et doser l'excès de sel argentique par CNSAm versé à l'aide d'une burette 1/20 ou au 1/50. Soit n le nombre de cc.

$$\text{Chlorémie plasmatique : } (5 - N) \frac{3,55}{3} = (5 - N) 1,183$$

b) *Cas des globules.* — Dans le cas de $V = 3$, prélever 200 cc. du filtrat et continuer comme en a. Soit v le nombre de cc. :

$$\text{Chlorémie globulaire : } (5 - V) \frac{3,55}{2,4} = (5 - v) 1,48$$

La valeur du rapport chloré érythroplasmatique :

$$R \text{ Cl} = \text{Cl globulaire} / \text{Cl plasmatique}.$$

Les chiffres obtenus par la technique de LAUDAT ou celle de PAGET sont identiques : l'une et l'autre sont d'ailleurs « également » recommandées par les auteurs sollicités par le Bureau de la Société de Chimie Biologique de réunir l'ensemble des conclusions techniques sur lesquelles existe un accord, constituant ainsi un mode opératoire qui pourra servir de référence pour des travaux ultérieurs (CHABANIER, Ch.-O. GUILLAUMIN, LAUDAT, LÉVY, PAGET et VAILLE).

<i>Chlore Globulaire</i>		<i>Chlore plasmatique</i>	
Réactif ferro	Laudat	Réactif ferro	Laudat
1,85	1,85	3,727	3,73
2,343	2,341	3,55	3,55
1,69	1,70	3,218	3,22
1,87	1,89	3,77	3,78

<i>Chlore Globulaire</i>		<i>Chlore plasmatique</i>	
Réactif ferro	Laudat	Réactif ferro	Laudat
1,65	1,66	3,44	3,44
1,79	1,80	3,65	3,66
2,13	2,13	3,727	3,71
1,56	1,56	3,20	3,20

Comme nous l'avons indiqué dans l'étude générale des réactifs, nous avons fait des essais à pH neutre et à pH abaissé. Nous avons obtenu des résultats identiques.

Nous avons de même mis en œuvre le procédé de M. VLADESCO (15) de défécation au ferrocyanure de cuivre.

Comme nous l'avons montré au début de cette étude, l'acétate de zinc peut sans inconvénient être remplacé par le sulfate de zinc.

SO ₄ ZN	VLADESCO	pH neutre (acétate)	pH abaissé (acétate)
3,4	3,4	3,4	3,4
3,76	3,76	3,76	3,76
3,55	3,54	3,55	3,55
1,86	1,85	1,86	1,86
1,92	1,90	1,92	1,92
1,87	1,86	1,87	1,88

II. — Action du déféquant sur quelques constituants organiques

A) CONSTITUANTS ORGANIQUES NON AZOTES

I. — GLUCIDES ET PRODUITS RÉSULTANT DU CATABOLISME

Le réactif de PAGET-DUPONT et celui de BAUDOIN-LEWIN (16) se comportent identiquement vis-à-vis des glucides sanguins. La détermination de la glycémie sur le liquide déprotéinisé par le ferrocyanure double devient donc possible. C'est ce que nous avons constaté avec le Professeur PAGET et Y. DUPONT (17).

Nos essais ont porté :

1. Sur des sangs anormaux, hyper et hypoglycémiques :

Réactif ferro- cyanozincique	Baudoin	Réactif ferro- cyanozincique	Baudoin
1,62	1,58	0,56	0,68
2,86	2,77	0,71	0,71
1,86	1,82	0,804	0,79
3,11	3,16	0,86	0,85

2. Sur des sangs putréfiés :

Séjour 10 jours à l'étuve 38°	1	0,08	0,09
— 15 jours à l'étuve 38°	2	0,04	0,03
— 15 jours à l'étuve 38°	3	0,05	0,05

Les glycémies initiales des sangs 1, 2 et 3 étant respectivement : 1,16, 1,27 et 0 gr. 96.

Il est certain que ces taux très faibles ne correspondent pas à du glucose, mais à des substances réductrices préexistantes dans le sang ou engendrées aux dépens des protides pendant le cours des phénomènes de putréfaction.

3. *Sur des sangs additionnés de quantités connues de glucose :*

Glycémie originelle : 0,88 + 1 gr. glucose 0/00 1,87 1,89

Glycémie originelle : 0,96 + 0,50 glucose 0/00 1,42 1,44

Glycémie originelle : 1,12 + 0,25 glucose 0/00 1,35 1,40

Les glycémies originelles représentent la moyenne arithmétique les chiffres obtenus par la méthode de Baudoin et par celle de Paget-Dupont.

4. *Sur des sangs recueillis aseptiquement sur l'oxalate de potassium et soumis à une glycolyse naturelle dont nous évaluons quotidiennement le degré.*

t = 18°	oxalate à 2	0/00	0 heure	1,14	1,16
			24 heures	0,91	0,94
			48 heures	0,68	0,68
			96 heures	0,29	0,27
			124 heures	0,16	0,14

Les résultats obtenus par le procédé de PAGET-DUPONT et par celui de BAUDOIN sont tout à fait comparables. Or, la technique de défécation au ferrocyanure de zinc est beaucoup plus simple que celle faisant appel au nitrate de mercure. Elle réussit toujours et n'exige pas grosse application. Son emploi mérite donc d'être vulgarisé.

Nous avons fait remarquer dans l'étude générale du réactif que l'on pouvait remplacer l'acétate de zinc par le sulfate de zinc.

Défécation par 0,05 et 1 cc.

d'acétate	1,04	1,09	1,73	0,95	1,12
-------------------	------	------	------	------	------

Défécation par 0,5 et 0,5

d'acétate et 0,5 de sulfate	1,04	1,064	1,73	0,98	1,11
-----------------------------	------	-------	------	------	------

Défécation par 0,05 et 1 cc.

de sulfate	1,05	1,06	1,75	0,99	1,11
--------------------	------	------	------	------	------

Les résultats sont donc identiques.

Nous avons aussi signalé qu'un auteur roumain Radu VLADESCO (18) avait voulu adopter au dosage du glucose un procédé de défécation par le ferrocyanure de cuivre.

Cet auteur utilise des solutions saturées de ferrocyanure de potassium et de sulfate de cuivre. La défécation s'opère ainsi : dans une fiole jaugée de 50 cc., on prend 5 cc. de sang, on ajoute 35 à 40 cc. d'eau et on agite lentement jusqu'à hémolyse complète, on ajoute ensuite 2 cc. 5 d'une solution saturée de sulfate de cuivre et on mélange bien en évitant la mousse. Après cela, on introduit 2 cc. 5 de solution saturée de ferrocyanure de potassium et de l'eau à 50 cc. On agite vigoureusement et après quelques minutes, on filtre à travers un papier filtre ordinaire.

La méthode de BAUDOUIN ne peut s'appliquer au filtrat car l'addition d'iode centinormal forme avec le cuivre en excès dans le filtrat $\text{CuI} + \text{I}$, d'où erreur par défaut dans le titrage par l'hyposulfite. Voici quelques chiffres que nous avons obtenus :

Réactif ferrocyanozincique ..	1,88	1,07	0,180	0,544
Ferrocyanure de cuivre	1,28	0,8	— 0,016	0,224

Il faudrait éliminer l'excès de cuivre par l'hydrogène sulfuré par exemple et l'excès d'hydrogène sulfuré par un courant d'air, ce qui complique bien inutilement le dosage.

Dans l'étude générale du réactif déféquant, nous avons indiqué deux techniques, l'une à pH neutre, l'autre à pH abaissé. A pH abaissé, on neutralise par la soude décinormale les 15 cc. de filtrat et l'on opère comme à pH neutre. Les résultats obtenus sont concordants :

pH neutre	pH abaissé
0,58	0,64
0,64	0,67
0,92	0,97
0,93	1,03
1,072	1,112
1,88	1,94
3,64	3,84

Influence de la dilution. — De légères différences sont observées lorsqu'au lieu d'opérer sur 15 cc. de filtrat, on effectue le dosage sur des prises de 3, 5, 10 cc. diluées ensuite à 15 cc. Voici quelques chiffres qui en témoignent :

Prise de 15 cc.	1,792	1,40	1,97	1,80
Prise de 10 cc.	1,832	1,504	1,99	1,88
Prise de 5 cc.	1,880	1,536	2,09	1,99
Prise de 3 cc.	1,896	1,60	2,12	2,08

On peut aisément obvier à cet inconvénient en effectuant la défécation sur du sang préalablement dilué au 1/2 au 1/3 ou au 1/4 selon l'hyperglycémie, supposée existante.

Dans ce cas les différences s'atténuent et le dosage reste correct.

Nous avons aussi, à l'instar de BAUDOIN, recherché l'influence du chauffage en milieu alcalin sur la concentration des composés réducteurs. Un point semble acquis :

aux concentrations réalisées dans notre protocole expérimental à pH neutre, un chauffage plus prolongé peut provoquer des résultats aberrants.

Temps de chauffe	Défécation à pH neutre				Défécation à pH abaissé			
	A	B	C	D	A	B	C	D
0 minute		0	0			0	0	0
2 minutes		1,872	0,552	3,152		1,864	0,656	3,672
3 —	1,480	1,883	0,632	3,160	1,584	1,880	0,688	3,600
4 —	1,485	2,064	0,672	3,248	1,671	1,920	0,752	3,832
6 —	1,488	2,144	0,864	3,280	1,712	1,936	0,864	3,736
8 —	1,504	2,160	0,912	3,360	1,824	2,056	0,976	3,736
10 —	1,528	2,088	1,024	3,392	1,880	2,136	1,024	3,792
12 —	1,520				2,040			
15 —	1,552				2,320			
20 —	1,568				2,40			

L'influence de l'alcalinité est indéniable : la libération de nouveaux composés glucidiques peut être le fait d'un chauffage en présence d'un excès de soude. Un chauffage prolongé en milieu hypercalcalin peut éventuellement engendrer des composés susceptibles de solubiliser une partie de mercure réduit et de modifier la physionomie du résultat terminal.

Q de NaOH N/I	Défécation à pH neutre				Défécation à pH abaissé			
		B	C	D		B	C	D
O cc 6	1,32	1,84	0,512	2,960	1,032	1,83	0,552	3,464
O cc 8	1,48	1,88	0,576	3,042	1,16	1,88	0,616	3,616
I cc	1,56	1,94	0,584	3,120	1,175	1,86	0,648	3,600
I cc 2	1,72	1,96	0,768	3,320	1,456	1,92	0,760	3,760
I cc 4	1,88	1,96	0,936	3,384	1,264	1,98	0,760	3,704

Cette influence n'est cependant pas de nature à modifier les résultats du dosage pourvu que ce dernier soit conduit conformément au protocole suivant :

1. *Sang total fluoré.*

a) Défécation à pH neutre : technique de PAGET et DUPONT. — Diluer 1 cc. de sang total dans 15 à 20 d'eau distillée, ajouter successivement 0 cc. 5 de solution A et 1 cc. de solution B. Agiter après chaque addition ; compléter à 30 cc., filtrer sur filtre en cellulose pure.

b) Réduction de la liqueur iodomercurelle. Prélever 15 cc. du filtrat bien agité et les verser dans un tube en verre Pyrex. Les additionner de 1 cc. de solution iodomercurelle et de 1 cc. de soude normale (ne pas tenir compte du précipité blanc d'hydrate de zinc qui se forme après addition de soude. Cet hydrate facilite la dispersion du mercure réduit et évite l'emploi ultérieur de sulfate de baryum préconisé par FLEURY). Plonger le tube bouché au coton dans un bain-marie bouillant. L'y laisser 3 à 5 minutes. Le retirer et le refroidir rapidement.

c) Ajouter ensuite 2 cc. 5 d'acide sulfurique normal et 4 cc. d'iode centinormal. Bien agiter. Laisser en repos quelque temps. Bien agiter à nouveau et titrer par l'hypo-sulfite centinormal. Soit n la quantité d'iode combinée au mercure :

$$G = n \times 0,804$$

2. *Plasma ou sérum.*

Défécation analogue, mais la dilution finale sera au 1/30

1 cc. de plasma et 0,25 et 0,50

1 cc. de sérum et 0,20 et 0,40

3. *Défécation à pH abaissé.* — (Technique personnelle).

Diluer 1 cc. de sang total dans 15 à 20 d'eau distillée. Ajouter successivement 0 cc. 5 de solution A, 1 cc. d'acide sulfurique normal et 0 cc. 5 de solution B. Agiter après chaque addition. Compléter à 30. Prélever 15 cc. de filtrat; les neutraliser par la soude normale et les verser dans un tube en verre Pyrex. Continuer comme précédemment.

Sucre protéidique

1. Hydrolyse suivant la méthode de BIERRY (19 et 20) : 3 cc. de plasma sont introduits dans 10 cc. d'eau distillée et 1 cc. de SO_4H_2 au 1/4 (en volume) dans un ballon jaugé de 50 cc. Boucher et porter 30 minutes à l'autoclave à 120° . Neutraliser exactement avec de la soude 2N et étendre à 30 avec de l'eau.

2. *Défécation* : 10 cc. de la solution sont traités par 0 cc. 5 et 1 cc. Dilution à 50 et filtration.

3. Le dosage est fait comme il est indiqué pour la glycémie. Soit G le glucose total et g la glycémie originelle :

$$G - g = \text{sucre protéidique.}$$

Glucose total	Glycémie libre	Sucre protéidique
1,608	0,563	1,045
3,872	2,56	1,312
2,544	1,056	1,488
1,600	0,576	1,024
2,550	1,032	1,528

Les chiffres obtenus selon technique originale de BIERRY diffèrent de 5 à 6 % (différence en moins) de ceux que nous avons recueillis par notre méthode.

Lactacidémie

BOAS, puis FURTH, JÉRUSALEM, et enfin MONDSHEIM préconisèrent des méthodes tendant à transformer par oxydation l'acide lactique en acétaldéhyde, qu'on dose par distillation.

Ces techniques ayant le défaut de vouloir doser un corps très instable et donnant souvent des chiffres contradictoires, PAGET et DECONNINCK (21) ont suivi la méthode indiquée par Klaus HANSEN et JEWILL basée sur la transformation de l'acide lactique en acide acétique, stade que ne peut dépasser l'oxydation par le mélange sulfochromique employé à des températures et à des concentrations déterminées.

La désalbumination se fait en général à l'acide tungstique provenant de l'action de l'acide sulfurique normal sur le tungstate de soude à 10 %. On peut y substituer le ferrocyanure double ainsi que le montrent les chiffres suivants :

Ferrocyanure	0,33	0,28	0,30	0,22	0,25
Tungstate	0,31	0,26	0,30	0,20	0,23

1. *Désalbumination.* — Diluer 5 cc. de sang défibriné dans 20 à 25 d'eau, ajouter 2,5 de ferrocyanure et 5 d'acétate, compléter à 50. Agiter, filtrer sur cellulose pure.

2. *Séparation du glucose.* — Prendre 20 cc. du filtrat, ajouter 1 cc. de sulfate de cuivre à 10 % et 2 cc. de suspension de chaux à 10 % pour séparer le glucose. Boucher soigneusement et agiter pendant trente à quarante minutes. Centrifuger rapidement, filtrer le liquide clair qui ne doit pas donner de réaction à l' α naphtol.

3. Reprendre 11 cc. 5 de filtrat qu'on place dans une fiole d'ermenmeyer de 25 cc. Ajouter 5 cc. de solution de bichromate de potassium à 0 gr. 762 0/00 et 20 cc. d'acide sulfurique composée de 4 cc. 6 d'acide pur et 15 cc. d'eau.

La fiole bouchée soigneusement à l'aide d'un bouchon de caoutchouc est portée au bain-marie à 60° pendant 40 minutes.

Extraire le récipient du bain-marie. Ajouter 2 cc. d'iodure de potassium à 10 % et titrer l'iode par l'hypo-sulfite correspondant au bichromate employé.

Opérer de la même façon avec un tube témoin. Le résultat est donné par la différence des deux dosages : 1 cc. de la solution d'hyposulfite correspond à 0 mg. 35 d'acide lactique ou 0 gr. 35 0/00.

II. — LIPIDES

Le ferrocyanure double de potassium et de zinc retient intégralement le cholestérol. C'est ce que nous avons vérifié sur le sang de la manière suivante :

2 cc. de sérum ou de plasma non hémolysé sont introduits dans une ampoule à décantation et on dose la cholestérolémie par la méthode de Grigault (FLEURY, 22).

Dosage du cholestérol

Deux autres cc. sont introduits dans un tube cylindro-conique additionnés d'environ 15 cc. d'eau distillée, puis de 0 cc. 5 de solution de ferrocyanure et de 1 cc. d'acétate. On agite après chaque addition et on centrifuge. Le liquide surnageant est retourné dans une ampoule à

décantation et on pratique une extraction éthéro-alcoolique suivant la méthode de Grigaut, ce qui permet de constater l'absence de tout résidu au bain-marie, et la non obtention de la coloration de Liebermann.

Par ailleurs, le ferrocyanure double de potassium et de zinc possède la propriété d'être dissous dans la soude en reproduisant le liquide initial. Cette propriété intéressante permet le dosage du cholestérol sur le culot de centrifugation. Celui-ci est dissous dans 0 cc. 5 de lessive de soude et introduit dans une ampoule à décantation. On rince le tube de centrifugeuse à l'eau distillée. On agite le liquide avec 20 cc. d'alcool à 60, puis 15 cc. d'éther, et ensuite on dose le cholestérol.

Nous avons toujours retrouvé dans le culot de centrifugation le même taux que dans le sérum pur. La réaction de Liebermann pratiquée sur le résidu d'extraction du filtrat a toujours été négative.

Sérum	Culot	Filtrat
1,97	1,96	0
2,30	2,36	0
2,25	2,10	0
1,52	1,49	0
1,75	1,70	0
1,80	1,79	0
1,71	1,69	0

Ceci permet, lorsqu'on dispose de peu de sang, de doser sur 1 cc., d'une part le glucose ou les chlorures et de l'autre le cholestérol. 1 cc. de sérum est déféqué par 0,25 et 0,5 et on complète à 20. Sur 10 cc. du centrifugat on dose le glucose et, sur le culot le cholestérol.

B) CONSTITUANTS ORGANIQUES AZOTES

I. — L'URÉE

Le réactif ferrocyanozincique laisse passer intégralement l'urée dans le filtrat. Nous avons vérifié par de nombreux dosages l'azote total et d'indice hypobromique sur du sang et des solutions pures d'urée la non adsorption de ce protide (23).

5 cc. d'une solution d'urée à 10 0/00 sont déféqués avec 0,25 et 0,5 ; 0,5 et 1 ; et avec 1 et 2. On étend à 30 et on filtre. Dosage sur 5 cc. de filtrat et sur 5 cc. de solution prise également diluée :

Solution pure	3 mg. 65 d'azote
Après défécation par 0,25 et 0,5 .. .	3,64
Après défécation par 0,5 et 1 .. .	3,64
Après défécation par 1 et 2	3,58

De même avec une solution à 1 0/00 avec les différents déféquants :

Solution pure	0,465 d'azote
Après défécation par le ferrocyanure double	0,465
Après défécation par l'acide phosphotungst.	0,469
Après défécation par l'acide trichloracé- tique à 30 0/00	0,465
Après défécation par l'acide trichloracé- tique à 20 %	0,469

La teneur d'un sang en urée a été augmentée par l'addition à ce sang d'une solution d'urée à 1 0/00. On retrouve toujours après dosage la quantité d'urée dont le sérum

avait été additionné. La défécation ferrocyanozincique a été conduite ainsi :

3 cc. de sérum + 5 cc. d'eau + 5 cc. d'urée 1 0/00 + eau jusqu'à 15. Dosage sur 5. Avec l'acide trichloracétique, on ajoute 1 cc. d'urée à 2 cc. de filtrat.

Azote total du sérum normal par l'acide trichlor-	
acétique	0,372
Le réactif ferrocyanozincique	0,280
Différence	0,092
Même sérum + urée à 1 0/00 : ac. trichl.	0,836
R. Ferrocy	0,732
Différence	0,104
Azote de l'urée. — at : 0,836 — 0,372	0,464
fz : 0,732 — 0,280	0,452

Nous avons fait des mesures d'indice hypobromique sur divers sangs. 10 cc. de sérum sont déféqués et étendus à 30 cc. Après centrifugation ou filtration, le filtrat est introduit dans l'uréomètre.

Déféc. à l'at : 0,72 0,34 0,40 1,12 4 gr. (Fichou)
 Déféc. à Fz : 0,71 0,34 0,39 1,10 4 gr.

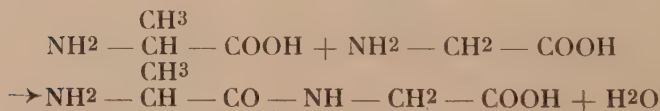
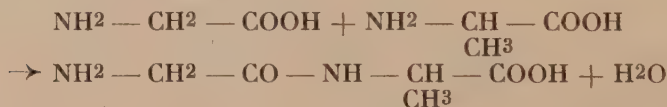
La teneur en urée d'un sang a été augmentée par addition à ce sang d'une solution d'urée à 1 0/00. On retrouve toujours après dosage la quantité d'urée dont le sérum avait été additionné.

Ac. tric.	0,86	0,67	0,70	1,06	2,5
R F Z	0,85	0,67	0,70	1,05	2,5

II. — LES POLYPEPTIDES

Définition. — Les polypeptides (PAGET, 24 et 25) font partie du groupe très vaste des protides qui, d'après la définition internationale « désignent les acides aminés naturels et les substances qui, par hydrolyse, donnent un ou plusieurs de ces acides aminés ». Ils sont représentés par les produits naturels ou synthétiques fournis par l'union de plusieurs acides aminés et dans lesquels la liaison a lieu par perte d'une molécule d'eau entre un groupement amine d'une molécule et un groupe carboxyle appartenant à la molécule suivante.

Considérons deux acides aminés : le glycocolle et l'alanine par exemple. On se rend facilement compte que ces deux acides en se combinant peuvent donner naissance à deux dipeptides.



Chacun de ces dipeptides peut, à son tour, réagir sur d'autres acides aminés et permettre ainsi le passage à des tri-tétra-penta-polypeptides. On conçoit aisément que le nombre des isomères d'un peptide est fonction du nombre d'acides aminés entrant dans sa constitution. On prévoit ainsi la complexité et l'hétérogénéité possible de certaines molécules surtout si l'on tient compte de l'existence des isomères optiques. Les polypeptides sont donc caractérisés :

1. Par la nature des acides aminés constituants.
2. Par le nombre de ceux-ci dans la molécule.
3. Par leur ordre d'arrangement.

Propriétés. — Elles ont été magistralement établies par le regretté professeur BLANCHETIÈRE (26). C'est en suivant ses directives que nous les indiquerons.

Les peptides ont un caractère amphotère comme les amino-acides eux-mêmes. Ils dissolvent en bleu l'hydrate de cuivre. Ils ont des constantes de dissociation acides et basiques, un point isoélectrique et un pouvoir rotatoire déterminés. Leur saveur est amère. Leurs propriétés physiques et chimiques dépendent d'ailleurs de leur constitution. C'est en fonction de celles-ci qu'elles doivent être étudiées.

1. Propriétés dépendant de la longueur de la chaîne :

Au point isoélectrique, les peptides complexes sont difficilement solubles. L'acide phosphotungstique, le tannin ne les précipitent qu'à un pH déterminé et encore ne précipitent-ils que les peptides à longues chaînes. Ils sont généralement doués de pouvoir rotatoire. La plupart des dipeptides ne donnent pas la réaction du biuret qu'on observe, au contraire, chez les tripeptides. Son intensité augmente avec l'accroissement de la chaîne.

2. Propriété dépendant de la nature des amino-acides du peptide :

Les polypeptides mixtes, c'est-à-dire ceux composés d'acides aminés différents, sont plus solubles dans l'eau que ceux résultant de la condensation d'un seul élément.

La plupart sont insolubles dans l'alcool.

Ceux qui renferment des diaminoacides sont beaucoup plus facilement précipitables par l'acide phosphotungs-

tique que les autres. En outre, les peptides qui renferment au moins une molécule de cystéine ou de tyrosine sont précipités par le sulfate d'ammonium, ceux d'entre eux qui comprennent dans leur molécule une forte proportion de glycolle, de phénylalanine ou de proline sont particulièrement résistants à l'hydrolyse.

Enfin les peptides à aminoacides cycliques fournissent les réactions colorées spécifiques de ceux-ci. C'est ainsi que ceux qui renferment de la phénylalanine ou de la tyrosine donnent celles de Millon, de Folin et Denis, ceux dérivés du tryptophane donnent la réaction d'Adamkiewicz, etc., etc...

3. Propriétés ayant pour origine l'ordre de liaison des amino-acides dans la molécule :

L'hydrolyse par les ferments protéolytiques dépend de l'ordre d'enchaînement des aminoacides. C'est ainsi que les dipeptides dans lesquels l'alanine est l'acide aminé acylant, sont facilement hydrolysés par la tryptase ; au contraire, ceux dans lesquels le carboxyle de l'alanine est libre sont « trypsinorésistants », etc., etc...

Quelques exemples. — On trouve *in vivo* un certain nombre de composés de nature polypeptidique.

1. L'un des plus importants, parce que intervenant essentiellement dans les phénomènes d'oxydoréduction cellulaire, est le glutathion d'Hopkins. Le glutathion est un tripeptide de l'acide glutamique, du glycolle et de la cystéine. Il se trouve dans le sang et peut y être dosé.

2. L'insuline en est un autre exemple. JENSEN aurait isolé des produits d'hydrolyse de cette hormone : l'arginine, l'histidine et la leucine.

3. La tuberculine serait également de nature polypeptidique.

4. Enfin, les substances d'Oriel, les « cryptotoxines » d'Achard, la supposée « anatoxine » de l'anaphylaxie de Richet, les « protéines dégradées » de la colloïdoclasie de Vidal ne seraient autre chose que des polypeptides plus ou moins complexes.

Mais à côté de ces peptides bien différenciés, il y a lieu de placer le bloc des polypeptides indifférenciés résultant de l'hydrolyse ménagée des protéines endogènes et exogènes. Ces peptides à constituants non identifiés pour la plupart existent dans les humeurs de l'organisme. Leur azote constitue même une part importante de ce qu'on appelle « l'azote résiduel » du plasma qui, on le sait, représente la différence entre l'azote total extra-protéinique et l'azote uréique.

Son évaluation se fait actuellement par deux types de méthodes. Le premier type comprend des techniques titrimétriques, le second, des procédés colorimétriques. Un point est commun à ces méthodes : l'emploi de deux réactifs déféquants dont l'un, l'acide trichloracétique, laisse passer les polypeptides, l'autre retenant protéines et peptides. Un dosage différentiel fournira imparfaitement la solution du problème cherché.

Dans leur méthode du double azote (28, FIESSINGER), CRISTOL (29, 30, 31) et PUECH (7) ont envisagé l'emploi de deux désalbuminants : l'acide trichloracétique suivant la technique de MOOG en mélangeant à parties égales du sérum à l'acide trichloracétique à 20 % et l'acide phosphotungstique utilisé de la manière suivante :

Plasma ou sérum	1 vol.
Phosphotungstate de sodium à 10 % .. .	1 vol.

Eau distillée 2 vol.

Acide sulfurique 2/3 N 1 vol.

Tandis que le premier laisse passer dans le filtrat les substances azotées à grosse molécule du type polypeptide, le second les précipite et ainsi par l'emploi simultané de ces deux désalbuminants, on peut effectuer le dosage des polypeptides du sang.

CRISTOL et PUECH basent cette méthode sur deux preuves ; une preuve qualitative : un liquide renfermant les produits de digestion pancréatique d'un protide comme la caséine, fournit les réactions de Tanret et du biuret positives ; après précipitation du milieu par le phosphotungstate de soude, ces réactions sont négatives ; une preuve quantitative : quand on ajoute à du sérum une quantité connue d'une solution de peptone, on constate ce qui suit : le taux du double azote est à peu près équivalent au total des chiffres du double azote trouvés pour chacun de ces deux liquides dosés séparément.

Ces deux expériences répétées par d'autres et dont les résultats ont été retrouvés justifient l'emploi des deux désalbuminations pour doser les polypeptides et déterminer l'indice de polypeptidémie.

Ces méthodes présentent quelques causes d'erreur comme on peut s'en rendre compte en se rapportant aux propriétés fondamentales des polypeptides. L'acide phosphotungstique ne précipite pas tous les peptides, et ce, quel que soit le pH. Nous avons vérifié, entre autres faits, que l'acide phosphotungstique et notre réactif ferrocyanozincique ne touchent pas au glycylglycine. L'azote diffusible dosé sera donc entaché d'une évaluation erronée « par défaut ». Ces critiques s'adressent également à notre technique dans laquelle l'azote dit « polypeptidique »

représente la différence « azote total du filtrat trichloracétique » moins « azote total du filtrat ferrocyanozincique », les deux termes de la soustraction étant obtenus par titrimétrie après kjeldahlisation. D'autre part, la minéralisation de l'azote organique n'est pas complète par la méthode de KJELDAHL, car la proline, l'oxyproline et l'histidine intégrés dans une molécule peptidique, se dérobent à une hydrolyse avancée.

Pour la minéralisation de l'azote de ces filtrats nous avons utilisé (23) la méthode de PARNAS et HELLER (DERRIEN FONTÈS, 34) extrêmement sensible et précise puisque le virage du rouge de méthyle se fait à la goutte, ce qui, avec une microburette au 1/100, équivaut au centième de centimètre cube et correspond à 2 mg. d'azote par litre si l'on opère sur un centimètre cube de sang. L'ammoniaque obtenue est recueillie dans dix centimètres cubes d'acide sulfurique N/70.

La minéralisation des filtrats ferrocyanozinciques est bien plus facile et plus rapide que celle des filtrats phosphotungstiques donnant presque toujours lieu à la formation d'oxyde de tungstène jaune insoluble. La difficulté de minéralisation des filtrats trichloracétiques est aussi bien connue. R. MARTENS (35 et 36), après avoir suivi la méthode de LAUDAT préconisant un mélange d'acide sulfurique et d'acide phosphorique, celle de BOIVIN (37) conseillant l'ébullition du mélange en présence de sulfate de potasse, sulfate de cuivre et oxyde de mercure, s'est arrêté à l'emploi du perhydrol comme oxydant suivant la technique de Saccardi. C'est celle que nous avons suivie. On ajoute au filtrat un centimètre cube d'acide sulfurique et une pincée de sulfate de potasse et de sulfate de cuivre suivant la technique de PREGL. On chauffe vingt minutes

après la fin de la carbonisation. On ajoute alors trois gouttes de perhydrol. On chauffe cinq minutes. On renouvelle ces deux opérations trois fois de suite, et après la dernière addition de perhydrol, on chauffe encore quinze minutes. Le liquide est alors prêt pour la distillation.

Nous avons d'abord cherché, comme CRISTOL et PUECH, la proportion de réactif déféquant à utiliser pour obtenir la meilleure défécation. Nous avons opéré sur diverses solutions peptones à 1 % : une peptone de caséine, une peptone spongieuse, une peptone « Roche » et une peptone « Codex ». Nous nous sommes arrêtés à la dose à partir de laquelle il y avait négativité des réactions de Tanret, du biuret et de Millon, ainsi que le montre le tableau suivant, le dosage ayant été conduit ainsi : 5 cc. sont déféqués et portés à 30 cc. Dosage sur 6 cc. de filtrat (= 1 cc. de peptone).

Quantité de défécant pour 6 cc. de solution de peptone	Azote résiduel	Biuret	NO 3 H	Tanret	Millon	Ferrocyanure + ac. acétique	Ac. trichl.	Ac. Phospho
Peptone "CODEX"								
Solution de peptone pure	14	+++	+++	ppté à froid sol à chaud	ppté devenant rouge	()	léger trouble	trouble accusé
Déféquée par le ferrocyanure acétate avec								
0,1 - 0,2	9	+	+++	O	troub. dev. rosé	O	O	trouble
0,2 - 0,4	7,2	+	+++	O	trouble rosé	lég. tr.	O	O
0,25 - 0,50	6	+	+++	O	léger tr. rosé	lég. tr.	O	O
0,50 - 1,0	4,4	—	++	O	O	lég. tr.	O	O
0,75 - 1,5	4,3	—	++	O	O	trouble	O	O
1,0 - 2,0	3,7	—	++	O	O	faible ppté	O	O
1,25 - 2,50	3,6	—	+	O	O	ppté	O	O
1,50 - 3,0	3,5	—	+	O	O	ppté	O	O
1,75 - 3,5	3,4	—	+	O	O	ppté	O	O
2,0 - 4,0	3,3	—	+	O	O	ppté	O	O
Peptone de CASÉINE								
pure	13,3	+++	+++ ppté	ppté	ppté jaune	O	ppté	ppté
Déféquée par le ferrocyanure acétate avec								
0,1 - 0,2	7	+	+++	ppté faible	ppté jaunâtre	O	O	O
0,2 - 0,4	5,3	+	++	trouble	trouble	O	O	O
0,25 - 0,50	4	+ —	++	O	tr	léger tr	O	O
0,50 - 1,0	3,1	—	+	O	O	l tr	O	O
0,75 - 1,5	2,8	—	+	O	O	tr	O	O
1,0 - 2,0	2,7	—	+	O	O	faib. ppté	O	O
1,25 - 2,50	2,6	—	+	O	O	ppté	O	O
1,50 - 3,0	2,6	—	+	O	O	ppté	O	O
1,75 - 3,5	2,5	—	+	O	O	ppté	O	O
2,0 - 4,0	2,5	—	+	O	O	ppté	O	O

Quantité de défécant pour 6 cc. de solution de peptone	Azote résiduel	Biuret	NO 3 H	Tanret	Millon	FeCy 6 K4 + CH3 COOH	Ac. trichl.	Ac. phosph.
Peptone " ROCHE "								
pure	14,9	+++	+++	ppté abond	ppté rouge	O	ppté	ppté
Déféquée au ferrocyanure acétate avec								
0,1 - 0,2	8,8	++	+++	trouble	tr. rosé	O	O	tr.
0,2 - 0,4	7,4	++	++	O	tr.	O	O	O
0,25 - 0,50	6,6	++	++	O	O	tr.	O	O
0,50 - 1,0	5,4	+	+	O	O	tr.	O	O
0,75 - 1,5	4,4	+	+	O	O	tr.	O	O
1,0 - 2,0	4,2	+	+	O	O	ppté	O	O
1,25 - 2,50	4,0	+	+	O	O	ppté	O	O
1,50 - 3,0	3,6	+	+	O	O	ppté	O	O
1,75 - 3,5	3,6	+	+	O	O	ppté	O	O
2,0 - 4,0	3,5	+	+	O	O	ppté	O	O
Peptone SPONGIEUSE								
pure	14	+++	—	ppté abond	ppté rouge	O	ppté	ppté
Déféquée au ferrocyanure acétate avec								
0,1 - 0,2	5,6	++	—	trouble	ppté rouge	O	O	O
0,2 - 0,4	4,1	+	—	tr.	tr.	lég. tr.	O	O
0,25 - 0,5	3,3	+	—	O	O	tr.	O	O
0,50 - 1,0	2,4	+	—	O	O	faible ppté	O	O
0,75 - 1,5	1,3	—	—	O	O	ppté	O	O
1,0 - 2,0	0,8	—	—	O	O	ppté	O	O
1,25 - 2,5	0,7	—	—	O	O	ppté	O	O

Les peptones nous donnent donc des résultats analogues et aux doses de réactif déféquant utilisées, les filtres ont toujours présenté des réactions du biuret, de Tanret et de Millon négatives et, n'ont jamais donné de précipité avec l'acide trichloracétique et l'acide phosphotungstique.

Les valeurs de l'azote résiduel sont voisines avec les deux réactifs et présentent une différence avec celles de l'acide trichloracétique, ainsi que la théorie le postule. Le tableau montre ces valeurs :

PEPTONES	AZOTE Total	AZOTE RÉSIDUEL		
		après ac. tr.	après ac. ph.	après ferro
Céséine....	13,3	5,5	4,9	4,8
Spongieuse.	14	12,5	3,3	3,3
Roche.....	14,9	13,7	6,5	6,6
Codex.....	14	12,9	5,8	4,4

Comme nous l'avons montré précédemment l'urée n'est pas adsorbée par le réactif déféquant.

D'autres essais ont porté sur un certain nombre d'acides aminés. Pour certains : glycolle, glucosamine, acide glutamique, leucine, on trouve des taux d'azote équivalents au total des chiffres trouvés pour le sérum et pour l'acide séparément. De même pour le dipeptide glycylglycine qui n'est donc précipité ni par l'acide phosphotungstique ni par le réactif ferrocyan-zincique :

		Ac. aminé	Sérum	s + a c	Différence
Glycocolle	Acc. trichl	0,480	0,320	0,798	0,48
	R. Ferr. z		0,252	0,736	0,48
Glycocolle	Acc. trichl	0,470	0,486	0,963	0,477
	R. Ferr. z		0,353	0,828	0,475
Glucosamine	Acc. trichl	0,473	0,486	0,963	0,477
	R. Ferr. z		0,353	0,823	0,470
Ac. glutamique	Acc. trichl	0,482	0,486	0,963	0,477
	R. Ferr. z		0,353	0,832	0,479

		Ac. aminé	Sérum	s + a c	Calculé	
Glycocolle	Acc. phosph.	0,477	0,346	0,415	0,413	
	Ferroc.	0,477	0,318	0,395	0,397	
Glucosamine	Pt	0,470	0,346	0,406	0,408	
	Fz	0,469	0,318	0,395	0,393	
Ac. glutamique	Pt	0,459	0,338	0,400	0,398	Acid. urique 41 mgrs 77
	Fz	0,460	0,320	0,388	0,390	
Glycylglycine	Pt	0,338	0,338	0,339	0,338	Azote corr. 13 mgrs 9
	Fz	0,338	0,320	0,330	0,329	

La question de certains autres acides aminés cycliques et acycliques est plus complexe. MARTENS a fait porter son étude sur le chlorhydrate de lysine, la d. arginine, la l. histidine et la l. proline. Il avait constaté que ces acides aminés sont précipités par l'acide phosphotungstique dans

des proportions variant de 15 à 85 %. Nous avons constaté des faits analogues avec les deux déféquants et obtenu des chiffres variables suivant la concentration de l'acide aminé additionné au sérum, et même, ce qui ne manque pas d'être curieux, selon la nature du sérum expérimenté. D'ailleurs CRISTOL avait constaté ce fait, mais il estimait que si le dosage d'un milieu de digestion naturelle ou artificielle, où le taux d'azote aminé dépasse 1 0/00, pouvait être entaché d'erreur sérieuse, il n'en était pas de même dans le sang où l'azote aminé ne dépasse pas 0 gr. 1 0/00.

La différence « azote total du filtrat trichloracétique » moins « azote total du filtrat ferrocyanozincique » oscille normalement entre 30 et 70 mg. Elle est donc légèrement supérieure à l'azote « trichloracétique » moins azote « phosphotungstique ».

	A	B	C	D	E	Cau	W	P
Acc. trichl	0,350	0,325	0,311	0,288	0,326	0,26	1,47	0,49
Ferrocyan	0,336	0,270	0,262	0,209	0,288	0,22	1,26	0,35
D	0,014	0,055	0,049	0,078	0,038	0,042	0,203	0,133
Urée							1,18	1,30

Si l'on tient compte cependant de l'excès différentiel imputable à la rétention de l'azote urique, et du comportement des acides aminés spéciaux étudiés plus haut, nous sommes autorisés à conclure que le réactif ferrocyanozincique se comporte sensiblement comme l'acide phosphotungstique vis-à-vis du bloc « polypeptidique ».

Dans les cas pathologiques où l'indice polypeptidémique de CRISTOL a été trouvé élevé, la différence azote « tri-

chloracétique » moins azote « ferrocyanozincique » s'est révélée aussi accusée, les variations « des deux différences » évoluant généralement dans le même sens.

Ac. trichl.	Ac. phosphot.	Ferro.	T — P	T — F
0,245	0,202	0,183	43	62
0,288	0,238	0,216	50	72
0,414	0,340	0,325	74	89
0,319	0,267	0,255	52	64
0,446	0,370	0,355	76	91
0,400	0,350	0,310	50	90
0,316	0,284	0,260	32	56
0,364	0,330	0,316	34	48
0,442	0,420	0,384	22	58

Les procédés colorimétriques d'évaluation des polypeptides ont été mis au point par GOIFFON et SPAEY (38 et 39) et par LEFAUX (40).

Voici le principe de leur méthode :

Les polypeptides sont évalués en fonction de la tyrosine qu'ils contiennent, cette tyrosine étant mesurée colorimétriquement. Sur les filtrats trichloracétique et phosphotungstique, on effectue la réaction colorée des phénols de FOLIN et DENIS à l'aide d'un réactif phosphotungstomolybdique. La différence d'intensité de coloration des deux filtrats, évaluée à l'aide d'une solution témoin de tyrosine donne l'index tyrosine des polypeptides du sérum

considéré, car l'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la quantité de tyrosine mise en jeu.

Nous nous sommes servis pour cette évaluation de la réaction xantho-protéique mise au point par M. LEFAUX. Les protéides donnent avec l'acide azotique à l'ébullition, une coloration jaune citron. Si on ajoute au mélange un excès de soude, la coloration jaune citron fait place à une coloration jaune foncé d'intensité beaucoup plus forte. Cette coloration est due au noyau phénolique de la tyrosine que contiennent les protéides.

La marche à suivre est la suivante : dans un premier tube à centrifuger, on introduit 3 cc. de sérum et 12 cc. d'acide trichloracétique à 30 0/00. Dans un deuxième tube à centrifuger, 3 cc. de sérum et 12 cc. d'acide phosphotungstique à 22 0/00.

On filtre ou on centrifuge fortement. Au bout de 15 minutes, on prélève 5 cc. de chacun des filtrats qu'on introduit dans deux tubes à essais Pyrex. On ajoute dans chacun d'eux 1 cc. de la solution témoin trichloracétique de tyrosine à 0,050 0/00, puis 1 cc. 5 exactement d'acide azotique pur. On porte à légère ébullition pendant quelques secondes, on refroidit bien et on ajoute goutte à goutte et en agitant 2 cc. 2 exactement de lessive de soude. Une coloration jaune très stable se développe immédiatement.

On compare alors avec 1 cc. 5 de la solution de tyrosine à 0,050 0/00 auxquels on ajoute 4 cc. 5 de la solution d'acide trichloracétique à 30 0/00, puis 1 cc. 5 d'acide azotique à l'ébullition et 2 cc. 2 de lessive de soude.

Soit H et H' les épaisseurs sous lesquelles les liqueurs ont même intensité colorée :

$$\left[\frac{H}{H'} \times 75 \right] - 50 = \text{mmg. de tyrosine par 0/00 de sérum.}$$

La défécation par le ferrocyanure double est conduite de la manière suivante :

3 cc. de sérum + 10 cc. d'eau + 0,75 de solution A et 1,50 de solution B. On complète à 15. Dosage sur 5 cc. du filtrat.

Les valeurs de l'index tyrosine obtenues présentent une différence avec celles de l'acide trichloracétique :

Ac. trichl.	52,7	75	39,8	42,3
Ferrocyanure	25	38,1	14,0	20,8
D	27,7	36,9	25,8	21,5

L'index tyrosine se révèle plus faible par la défécation au ferrocyanure double, mais son évaluation varie dans le même sens :

Acc. trichl.	Acc. ph.	F.A.	T. — P.	T. — F.
73	27,3	41,4	45,7	31,6
63	32	33,8	31,0	29,2
40,9	11,5	30,6	29,4	10,3
54	32,6	38	21,4	16,0
42	20,9	21,1	21,1	20,9
41	4,8	15	36,2	26
20,1	7,5	11,7	12,6	8,4
59,0	27,4	32,2	31,6	26,8
73,3	29,7	35,8	43,6	37,5

CHAPITRE TROISIEME

LE LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN

Sa défécation

Dosage de quelques-uns de ses constituants

C'est un liquide clair, séreux, à réaction alcaline ($\text{pH} = 8,26$). Il renferme des matières protéiques, des sels minéraux, du glucose, de l'urée, de la créatinine... Son analyse chimique a une grosse importance clinique.

A l'état normal, il ne renferme que de 0,10 à 0,30 d'albumine par litre, surtout de la globuline. Si on chauffe sans aciduler, cette globine ne coagule pas, mais on peut la précipiter par le sulfate de magnésie à saturation.

Le taux du chlorure de sodium est rigoureusement constant dans le liquide normal et voisin de 7,36.

Le glucose constitue l'unique corps réducteur du liquide normal. Dans certains cas pathologiques, il peut être accompagné de substances réductrices provenant des galactosides du cerveau ou du glycogène des leucocytes et des plexus. La quantité normale oscille chez l'adulte aussi bien que chez l'enfant entre 0,65 et 0,75 0/00.

Le taux d'urée est en général inférieur à l'uréoémie. Les chiffres rencontrés normalement oscillent entre 0,10 et 0,20. L'augmentation de l'urée sanguine est accompagnée

de celle de l'urée rachidienne et a la même signification clinique.

En outre, traces de polypeptides, acétone, créatinine.

Défécation à pH neutre. — Qu'il s'agisse de liquide normal ou de liquide hyperalbumineux, 5 cc. sont additionnés de 20 à 25 cc. d'eau. On ajoute 1/10 cc. de ferrocyanure et 2/10 d'acétate. On agite et on complète à 50.

Défécation à pH abaissé. — 5 cc. de L.C.R. sont additionnés de 20 à 25 cc. d'eau, 1/10 cc. de ferrocyanure, 2/10 cc. d'acide sulfurique normal et 1/10 cc. d'acétate. Agiter et compléter à 50.

Les filtrats très limpides sont totalement déprotéinisés. Ils peuvent être introduits dans l'uréomètre pour le dosage de l'urée par l'hypobromite. Les résultats sont identiques :

pH neutre	0,25	0,15	0,90	0,42
pH abaissé	0,23	0,18	0,87	0,40

Pour le dosage du glucose : 10 cc. du filtrat provenant de la défécation à pH abaissé sont neutralisés par quelques gouttes de soude normale, et 10 cc. provenant du filtrat résultant de la défécation à pH neutre sont versés dans deux tubes Pyrex avec 5 cc. d'eau distillée, 1 cc. de solution iodomercurielle et 1 cc. de soude normale. Porter trois minutes au bain-marie bouillant. Refroidir sous un courant d'eau. Ajouter après refroidissement 2 cc. 5 d'acide sulfurique normal et 5 cc. d'iode centinormal. Doser l'excès d'iode par l'hyposulfite de sodium centinormal. Soit n le nombre de cc. d'iode combinée au mercure :

$$G = n \times 0,402$$

pH abaissé	0,768	0,27	0,463	0,19	0,512
pH neutre	0,760	0,29	0,496	0,15	0,552

Pour le dosage des chlorures, 25 cc. provenant de l'une ou l'autre défécation sont additionnés de 5 cc. d'acide nitrique pur, 5 cc. de nitrate d'argent décimal et 2 cc. d'une solution saturée d'alun de fer ammoniacal. Agiter énergiquement pour caillebotter le précipité de chlorure d'argent. Laisser reposer une ou deux minutes et doser l'excès de sel argentique par le sulfocyanure d'ammonium versé à l'aide d'une burette au 1/20 ou au 1/50. Soit n le nombre de cc. versés :

$$\text{NaCl} = (5 - n) \frac{5,85}{2,50} = (5 - n) 2,34$$

pH neutre	7,02	7,00	5,8	6,55	6,66
pH abaissé	7,25	6,90	5,6	6,31	6,90

DEFECATION FERROCYANO-ZINIQUE DES LIQUIDES GASTRIQUES ET DUODENaux

Le liquide gastrique obtenu après repas d'épreuve est un liquide incolore, clair, fluide.

La composition du suc gastrique serait :

Matières solides	10 gr.
Matières organiques	4 gr.
Matières minérales (6 gr.) :	
HCl	1-2 gr.
NaCl	2 gr.
KCl	0,007
Phosphates de Ca, Mg, Fe ; diastases diverses	3 gr.
Eau	990 gr.

Nos essais ont porté :

1. sur des liquides prélevés après repas d'épreuve d'EWALD et VERPY.

2. sur des sucs d'histamine.

Ces liquides étant généralement acides, il importe de les neutraliser au préalable. Le volume de soude nécessaire est indiqué par le dosage de la chlorhydrie libre et de la chlorhydrie combinée qui aura été effectué initialement.

Les techniques de défécation sont les suivantes :

Défécation à pH neutre. — Neutraliser par la soude décimale 10 cc. de liquide étendu à 25. Ajouter 1 cc. de solution A et 2 cc. de solution B. Compléter à 150 et filtrer.

Défécation à pH abaissé. — 10 cc. de liquide sont additionnés de 30 cc. d'eau. Ajouter 1 cc. de ferrocyanure, 2 cc. d'acide sulfurique normal et 1 cc. d'acétate. Compléter à 150. Filtrer.

Les filtrats se prêtent au dosage rapide des chlorures.

100 cc. de filtrat + 5 cc. d'acide nitrique + 10 cc. de nitrate d'argent décinormal. Filtrer.

100 cc. de nouveau filtrat + 1 cc. d'alun de fer + n cc. de sulfocyanure de potassium décinormal jusqu'à coloration rouge stable.

$$\text{NaCl } 0/00 = 0,8775 (10 - 1,15 n)$$

pH neutre	3,1	2,7	2,9
pH abaissé	3,0	2,7	2,8

Pour les liquides duodénaux, il est inutile de neutraliser avant défécation.

Les techniques sont identiques.

DEFECATION FERROCYANO-ZINCIQUE DES EXSUDATS ET TRANSSUDATS

A l'état normal, la surface des membranes séreuses est simplement lubrifiée par un peu de liquide transsudé du plasma sanguin. A l'état pathologique, ce liquide peut augmenter de volume et constituer :

a) un exsudat, si l'épanchement est d'origine inflammatoire ;

b) un transsudat, s'il est dû à un obstacle s'opposant au cours régulier de la circulation.

Au point de vue chimique, on peut diviser les sérosités en deux grands groupes :

1. les liquides séreux à composition rappelant celle du plasma sanguin (liquides pleurétiques, péritonéaux, de kystes ovariens, d'hydrocèle) ;

2. les liquides séroïdes qui ne renferment pas de fibrinogène ou de sérine (L.C.R., liquide de kyste hydatique).

On peut les distinguer par la réaction de Rivalta : dans un verre à pied de 100 à 150 cc. on verse 50 à 60 cc. d'eau et une goutte d'acide acétique au demi, puis une goutte de la sérosité que l'on dépose avec précaution à la surface du liquide. Si c'est un exsudat, la goutte descend lentement, d'abord limpide, puis forme des stries bleuâtres devenant blanchâtres en arrivant au fond de l'eau.

Si c'est un transsudat, pas d'opalescence.

DEFÉCATIONS. — Dans les liquides à réaction de Rivalta nettement positive, donc à concentration albumineuse géné-

ralement supérieure à 30 gr., l'expérience nous a montré qu'il importait d'opérer comme pour le plasma sanguin.

Dans les liquides à réaction négative ou douteuse la quantité de liquide biologique mise en œuvre peut être doublée sans que les concentrations des réactifs soient modifiées. On peut se borner à une dilution au 1/30.

Le filtrat permet le dosage direct des chlorures et éventuellement du glucose. Cette dernière détermination est intéressante à effectuer dans les liquides de kyste hydatique. On peut y trouver jusqu'à 2 gr. 50 de glucose. Le taux de NaCl y est toujours très élevé, et, pour certains auteurs serait même tout à fait pathognomonique.

CHAPITRE QUATRIEME

LE LAIT

Sa défécation ferrocyno-zincique

Le lait est le produit d'excrétion des glandes mammaires. Il caractérise l'importante classe des mammifères. Malgré la diversité des espèces, le lait peut être considéré comme « une entité sécrétoire ayant sa physionomie propre et dont les grandes lignes sont toujours retrouvées quelle que soit l'espèce envisagée ».

Le lait étant essentiellement destiné à l'entretien et à la croissance du nouveau-né, doit renfermer tous les principes constitutifs de l'organisme animal, c'est-à-dire : protides, glucides, lipides et matières minérales.

Voici la composition d'un litre de lait de vache [PAGET (41)] :

Eau 900-910

Extrait sec (125 à 130 gr. :

· *Lipides* :

Beurre 35-40

Phospholipides (type lécithine) 0,50-0,75

Cholestérol et ses esters 0,1-0,175

Extrait délipidé ou dégraissé :

1. *Glucides* (Lactose) 47-52

2. *Protides* :

Protéines : caséine	27-30
lactalbumine	4-5
lactoglobuline	0,5
Acides aminés	0,3-0,4

3. Produits azotés d'excrétion (Urée, bases puriques, créatine, créatine)	1 gr. exprimé en azote
---	------------------------

4. *Matières salines* :

Sels minéraux	6,5-7
Sels alcalins, magnésiens, alcalino-terreux d'ac. citrique	2,5-2,8

Les constituants essentiels du lait de femme sont :

Extrait sec	132
Lipides	40
Sucres exprimés en lactose	72
Caséine	5,50
Albumine-Globuline	5,50
Sels	2

Par les dimensions des particules qui se trouvent au sein du liquide, le lait affecte tout à la fois les caractères d'une émulsion, d'une solution colloïdale et d'une solution vraie.

Emulsion par la dispersion de la matière grasse qui s'y trouve sous la forme de globules sphériques dont le diamètre oscille de $1\ \mu$ à $20\ \mu$.

Solution colloïdale par les albumines et globulines, les caséinates de calcium et de magnésium, les phosphates tricalcique et trimagnésien.

Solution vraie par les électrolytes NaCl, KCl, phosphates

mono et dipotassique, citrates magnésien et tricalcique et par les non électrolytes qui comprennent le lactose et l'ensemble des substances azotées dont l'azote représente l'azote non protéique du lait : urée, créatine, acides aminés.

Une bonne défécation éliminera donc les substances en émulsion et en pseudo-solution et laissera place à une solution vraie où l'on pourra doser aisément les glucides et les chlorures.

Le taux des glucides peut être déterminé par une technique dérivée de celle de BAUDOIN et déjà appliquée par FLEURY et MARQUE (42) au dosage du lactose dans le lait préalablement déféqué par le réactif de PATEIN. Mais il s'agit là d'un macrodosage mettant en œuvre d'importantes quantités de réactifs (30 cc. de liqueur iodo-mercurielle, 15 cc. d'iode décinormal).

Aussi nous sommes-nous ingéniés avec M. PAGET et Y. DUPONT (43) à mettre au point une microméthode d'exécution simple et sûre. Voici le détail de la technique préconisée. Elle s'applique au lait de vache et doit être rigoureusement suivie dans tous ses détails (observation minutieuse des dilutions, des concentrations de réactifs, durée de chauffage, etc...). Leur inobservance conduit en effet à des résultats aberrants qui tiennent au fait que la réduction de la liqueur iodomercurielle n'est vraiment spécifique du lactose que dans les conditions établies.

a) DÉFÉCATION DU LAIT

Diluer 1 cc. de lait dans 10 à 15 cc. d'eau. Additionner le mélange de 0 cc. 1 de solution de ferrocyanure de potas-

sium et de 0 cc. 2 de solution d'acétate de zinc. Agiter après chaque addition. Compléter à 50 avec de l'eau distillée. Agiter énergiquement. Filtrer.

b) RÉDUCTION ET DOSAGE

Prendre 2 cc. de filtrat correspondant à 1/25 cc. de lait. Compléter à 15 cc. avec de l'eau distillée. Les verser dans un tube Pyrex. Les additionner successivement de 1 cc. 2 de réactif iodomercureiel, de 1 cc. 2 de soude normale pure. Mettre au bain-marie bouillant trois ou quatre minutes. Retirer. Refroidir. Ajouter 2 cc. 5 d'acide sulfurique normal, 5 cc. d'iode centinormal. Bien mélanger. Laisser en contact trois minutes. Agiter ensuite énergiquement pendant 2 à 3 minutes (l'addition de sulfate de baryum est ici inutile, la dissolution de mercure se faisant très facilement par agitation directe). Doser l'excès d'iode par l'hypo-sulfite de soude centinormal.

Soit n le nombre de cc. d'iode combinée au mercure. La teneur en lactose par litre est donnée par la relation :

$$T = n \times 12,6$$

Pour les laits normaux, n oscille entre 3,5 et 4.

Sulfate	Acétate	S + A	Bertrand (métaph. et sous acét.)	Bertrand (Ferrocyane double)
45,59	45,11	45,16	45,49	45,32
41,56	40,95	41,31	41,45	40,98
42,98	43,34	43,23	42,90	42,91
38,20	38,43	38,55	38,08	38,28
30,02	30,74	30,50	29,93	29,94
43,39	43,97	43,41	43,36	43,53

La défécation à pH abaissé donne d'aussi bons résultats qu'à pH neutre. Voici la marche à suivre dans ce cas : 1 cc. de lait est dilué dans 10 à 15 cc. d'eau ; ajouter 0 cc. 1 de solution de ferrocyanure de potassium. Agiter. Ajouter 0 cc. 5 d'acide sulfurique normal puis 0 cc. 1 de solution d'acétate de zinc. Compléter à 50. Filtrer.

Prélever 2 cc. de filtrat. Compléter à 15 cc. avec de l'eau distillée. Les verser dans un tube Pyrex. Ajouter une goutte de soude normale. Continuer l'opération comme précédemment en additionnant de 1 cc. 2 de réactif iodo-mercuriel et 1 cc. de soude normale pure.

pH neutre	37,08	47,75	38,68	32,76	51,66
pH abaissé	67,71	48,37	39,31	33,26	51,91

LAIT DE FEMME

1 cc. de lait + eau + 0,10 et 0,20. Compléter à 50. Sur 1 cc. de filtrat (1/50) complété à 15, 1 cc. de réactif iodo-mercuriel, 1 cc. de soude normale. Ebullition. Refroidissement. 2 cc. 5 d'acide sulfurique, 5 cc. d'iode.

$$T = n \times 25,2$$

DOSAGE DES CHLORURES

Introduire, dans un ballon jaugé de 200, 2 cc. de lait, 100 d'eau distillée, 1 cc. de solution A et 2 cc. de solution B. Compléter à 200. Agiter. Filtrer. A 150 cc. de filtrat, ajouter 5 cc. d'acide nitrique et 10 cc. de nitrate d'argent décimormal. Agiter et filtrer à nouveau. Finalement 150 cc. de filtrat sont additionnés de 1 cc. d'alun de fer ammo-

niacal. Verser n cc. de sulfocyanure de potassium décimal jusqu'à coloration rosée stable.

$$\begin{aligned}\text{Chlorures en NaCl } 0/00 &= (10 - 1,1 n) 1000/15 \times 0,0585 \\ &= (10 - 1,1 n) 0,39\end{aligned}$$

C. M. S.

On possède ainsi rapidement les éléments de la constante moléculaire simplifiée, somme de lactose hydraté et du chlorure de sodium exprimé en son équivalent isotonique en lactose hydraté.

$$\text{C.M.S.} = L + \text{NaCl} \times 11,9$$

MATIÈRE GRASSE

Le lait est intégralement délipidé après défécation par le ferrocyanure double. Nous avons vérifié le fait de la manière suivante : 10 cc. de lait sont déféqués par 1 cc. de solution A et 2 cc. de solution B. On complète à 50. Après centrifugation puissante, le culot est dissous dans vingt gouttes de lessive de soude.

Cette solution peut être traitée comme le lait par la méthode d'extraction d'Adam MEILLÈRE.

Aucune particule de matière grasse ne subsiste dans le filtrat.

Lait pur	Culot	Filtrat
32,2	31,8	0
36,7	36,0	0
40,3	40,0	0
37,9	37,1	0
38,5	37,9	0

CONSERVATEUR

Dans le but de conserver les laits, on leur ajoute fréquemment une pastille de bichromate de potassium. Cet agent de conservation passe dans le filtrat lorsqu'on l'on opère la défécation à pH abaissé par addition d'acide. Lorsque l'on opère à pH neutre, le bichromate est retenu dans le précipité. Il ne commence à passer dans le filtrat qu'à des doses supérieures à 1 gr. 0/00. Au-dessous, il est totalement éliminé. Cette dose est d'ailleurs excessive.

CHAPITRE CINQUIEME

L'URINE

Sa défécation

L'urine est la voie par laquelle s'élimine la majeure partie des sels et des déchets azotés de l'organisme.

Une urine peut être anormale *qualitativement* quand elle renferme albumine, glucose ou autres glucides, pigments et sels biliaires, corps cétoniques, indoxyle urobiline en excès, etc..., *quantitativement* par une association vicieuse de ses principes normaux, ce que l'on met en valeur par l'évaluation des rapports urologiques.

L'analyse des éléments urinaires et leur dosage peut donc donner une multitude de renseignements sur les divers métabolismes.

Nous allons envisager successivement le comportement des constituants normaux : composés minéraux, chlorures et phosphates ; composés organiques, urée, acide urique, amino-acides ; les constituants anormaux : glucose, corps cétoniques, albumine et pigments, colorants et médicaments.

COMPOSANTS MINERAUX

CHLORURES

Le ferrocyanure double laissant intégralement passer

les chlorures dans le filtrat, leur dosage est extrêmement facile et peut s'opérer par sulfocynoargentimétrie.

15 cc. d'urine sont additionnés de 1 cc. 5 de A et 3 cc. de B. Après agitation, on complète à 150. 10 cc. de filtrat sont additionnés de 30 cc. de solution décimale de nitrate d'argent, 5 cc. d'alun de fer et 5 cc. d'acide nitrique pur. A l'aide d'une burette graduée, on fait alors tomber dans le liquide la solution normale de sulfocyanate jusqu'à teinte rose persistante.

$$\text{NaCl } 0/00 = (30 - n) 0,585.$$

On obtient des chiffres identiques à la méthode de DENIGÈS (44) :

Denigès	4,73	9,22	6,83	11,32	9,65	8,47
F.Z.	4,73	9,21	6,83	11,30	9,64	8,47

PHOSPHATES

Le dosage des phosphates par l'azotate d'urane doit être effectué sur l'urine pure. En effet, le ferrocyanure double précipite une fraction assez importante des phosphates. Cette fraction semble du reste assez constante, ainsi que le montre le tableau suivant :

P ₂ O ₅ de l'urine	P ₂ O ₅ après défécation	Prop. résiduelle
6 cc. 6 d'urane	0 cc. 80	0,8/6,6 1/8
10 cc. 25	1 cc. 25	1,25/10,25 1/8
7 cc. 25	0 cc. 90	0,90/7,25 1/8
5 cc. 40	0 cc. 65	0,65/5,4 1/8
8 cc. 10	1 cc.	1/8,10 1/8
9 cc.	1 cc. 10	1,10/9 1/8
7 cc 50	0 cc. 90	0,9/7,5 1/8

COMPOSANTS ORGANIQUES

URÉE

Ainsi que nous l'avons montré à propos du sang et du liquide céphalo-rachidien, l'urée passe intégralement dans le filtrat obtenu par défécation de l'urine. Nous avons opéré de nombreux dosages d'indice hypobromique sur l'urine pure et sur l'urine déféquée et nous nous sommes rendus compte de l'identité des résultats.

L'urine est déféquée par le 1/10 de son volume de solution A et les 2/10 de solution B ou C. Le dosage est effectué sur 1 cc. d'urine pure et 1 cc. 3 d'urine déféquée :

Urine pure	3,2	4,5	12,1	14,7	25,3	24,6
Urine déféquée	3,2	4,4	12,2	14,6	25,2	24,6

EVALUATION DE L'AZOTE AMINO-AMMONIACAL

La technique de défécation à la chaux de SORENSEN-MESTREZAT (45) donne des chiffres supérieurs à la technique de défécation au ferrocyanure double. Il y a en effet comme nous l'avons vu à propos du sang, rétention de certains acides aminés.

25 cc. d'urine sont déféqués par 2 cc. 5 de solution A et 5 cc. de solution B. 13 cc. du filtrat sont neutralisés par la soude décinormale en présence de phtaléine et additionnés de 20 cc. de formol au 1/2 neutralisé par NaOH N/10 en présence de phtaléine. La coloration rose disparaît. On la rétablit par la soude décinormale jusqu'à la teinte rose franc d'un témoin :

Sorensen	0,27	0,32	0,40	0,37	0,39	0,19
R. P-Z	0,21	0,23	0,35	0,30	0,30	0,15

URATES

Les urates sont totalement éliminés lorsque l'on opère la défécation habituelle. Cependant si l'on provoque la formation du précipité par addition de parties égales de solutions A et B, le ferrocyanure double est sans action sur l'acide urique. M. THIERRY (46) a appliqué cette propriété au dosage séparé dans l'urine de l'acide urique et des bases xanthiques. Dans une première opération, il dose sur l'urine pure par la méthode cyano-argentimétrique, l'acide urique et les bases xanthiques. Les résultats sont exprimés en acide urique.

Dans une deuxième opération pratiquée sur le filtrat provenant du traitement de l'urine par les solutions A et B à parties égales, il dose l'acide urique seul par cyano-argentimétrie. Les résultats sont encore exprimés en acide urique.

La différence entre les deux résultats ainsi obtenus donne les bases xanthiques exprimées en acide urique.

Voici le mode opératoire : 20 cc. d'urine sont additionnés de 25 cc. de liqueur argentico-ammoniac-magnésienne N/20 de DENIGÈS. On filtre. 100 cc. de filtrat (= 80 cc. d'urine) sont additionnés de 10 cc. de KCN N/10, X g. de IK à 10 % et on verse n cc. de NO_3Ag N/10.

Corps xanthoïriques (en ac. urique) = $n \times 0,21$

Dans une deuxième opération, déféquer 200 cc. d'urine par 20 cc. de solution A et 20 cc. de solution B en agitant. Filtrer. 120 cc. du filtrat (= 100 cc. d'urine) sont additionnés de 25 cc. de liqueur argentico-ammoniac-magnésienne. On filtre. 116 cc. de filtrat (= 80 cc. d'urine) sont traités comme précédemment. On verse n' cc. de NO_3Ag N/10 :

Acide urique = $n' \times 0,21$

La différence représentera les bases xanthiques.

Le dosage de l'acide urique supporte la comparaison avec le procédé de RONCHÈSE (47) ainsi que le montrent les chiffres suivants cités par THIERRY.

Ferrocyanure	0,462	0,420	0,336	0,340	0,588
Ronchèse	0,464	0,414	0,338	0,338	0,590

Notre expérience personnelle a été moins explicite dans ses résultats. Voici quelques-uns de nos chiffres :

Sur 10 cc. d'urine	0,37	0,34	0,52	0,41	0,19
Sur 12 cc.	0,34	0,26	0,46	0,35	0,17
(défécation (I + 1)					
Sur 13 cc.	0,03	0,00	0,04	0,04	0,00
(défécation (1 + 2)					

CONSTITUANTS ANORMAUX PATHOLOGIQUES

GLUCOSE

Le dosage du glucose urinaire est aussi facile que dans les autres liquides physiologiques. Le dosage par la liqueur de FEHLING est facilité par un virage net puisque l'urine est débarrassée des corps pouvant réduire la liqueur : acide urique, urates, albumine, pigments biliaires, urobiline.

L'urine déféquée et diluée, s'il y a lieu, est versée dans la liqueur cupro-tartrique portée à l'ébullition. Le chiffre de glucose obtenu est à multiplier par 1,3 pour tenir compte de la dilution due à la défécation.

On peut opérer aussi par la méthode de BERTRAND. Le ferrocyanure double a le gros avantage sur le réactif de COURTONNE de donner l'émulsion une liqueur absolument

limpide et de ne pas nécessiter l'élimination ultérieure de l'excès de plomb par l'acide sulfurique au quart.

R. de Courtonne ..	3,55	8,72	25,80	55,0	92,9
F.Z.	3,33	8,70	25,62	54,73	92

Les urines ont été additionnées de solutions de glucose à 10 %. Les quantités de sucre ajoutées ont été retrouvées :

R. Courtonne ..	6,60	9,30	17,83	32,41	51,37
F.Z.	6,48	9,72	17,68	32,08	51,00

OSAZONES

Le filtrat urinaire se prête aussi à l'obtention des osazones. Elles sont tout aussi caractéristiques que par la défécation mercurielle. Le point de fusion au bloc MAQUENNE est identique.

M. PAGET et P. CONSEIL (49) ont indiqué une technique pour les obtenir facilement et nettement, particulièrement dans les faibles teneurs de glucose en présence de lactose.

L'urine est déféquée et distillée au bain-marie entre 28 et 36° lus au thermomètre surmontant la colonne de VIGREUX. Le résidu de la distillation (1/4 ou 1/3 du volume initial) est additionné de ferrocyanure de potassium pour éliminer l'excès d'acétate de zinc qui ne gêne pourtant pas la formation des osazones (Veiller à ne pas mettre un excès de ferrocyanure qui donnerait avec la phénylhydrazine une coloration et un précipité rouge brun).

L'urine concentrée et déféquée permet de lever tous les doutes et d'identifier sûrement par voie microchimique : glucosazone, lactosazone, et mélange des deux.

CORPS CÉTONIQUES

Les corps cétoniques passent dans le filtrat comme les glucides. Nous avons effectué des dosages d'acétone sur l'urine pure et l'urine déféquée par distillation en présence d'acide phosphorique, formation d'iodoforme dans le distillat et dosage de l'excès d'iode par l'hyposulfite.

Les résultats sont identiques :

Urine pure	0,75	0,87	0,12	0,28	0,95	0,36
Urine déféquée	0,72	0,83	0,10	0,25	0,93	0,31

ALBUMINES

L'albumine, le pus, le sang, l'hémoglobine sont adsorbés complètement par le précipité de ferrocyanure double de potassium et de zinc.

Le filtrat montre la négativité complète des réactions de HELLER, de TANRET, du biuret, de MILLON.

PIGMENTS BILIAIRES

Les pigments biliaires sont retenus dans le précipité. On peut, du reste, retrouver leur présence en dissolvant le précipité dans la soude et en appliquant la technique de GRIMBERT (50) sur le résultat de cette dissolution. On obtient une belle coloration verte qui montre bien que les pigments biliaires étaient retenus dans le précipité.

UROBILINE

Après absorption du pigment par le précipité, le lavage à l'alcool permet de faire apparaître la fluorescence verte caractéristique.

INDOXYLE URINAIRE

Les dérivés indoxyliques ne sont pas retenus par le colloïde suspensoïde. On peut même sur le filtrat obtenir avec le chloroforme une coloration plus délicate et plus nette qu'avec l'urine pure.

Voici la technique à suivre : déféquer un volume V d'urine par V/10 de A et 2 V/10 de B. Filtrer. Prélever 15 cc. du filtrat. Ajouter 15 cc. d'HCl pur et 2 cc. de chloroforme. Agiter et laisser reposer. Le chloroforme se rassemble rapidement au fond du tube et se colore en bleu.

S'il n'y a pas de coloration, ajouter 11 g. d'eau oxygénée à 10 volumes diluée au 1/10 et agiter de nouveau.

COLORANTS

Les colorants basiques : bleu de méthylène, violet de gentiane sont retenus dans le précipité. Les colorants acides ne sont pas touchés : la phtaléine du phénol n'est pas retenue. L'épreuve de la P.S.P. peut se faire chez un malade en cours de traitement par le bleu de méthylène.

MÉDICAMENTS

L'acide salicylique, l'antipyrine se retrouvent dans le filtrat où on les caractérise aisément par leurs réactions colorées au perchlorure de fer.

La caféine est retenue dans le précipité, que l'on opère la défécation à pH neutre ou en utilisant parties égales de solutions à pH abaissé. La réaction de WEYDEL modifiée par DENIGÈS (51), pratiquée sur le résultat de l'extraction chloroformique, donne un résultat négatif.

L'acide picrique et son dérivé de réduction, l'acide picramique, sont retenus dans le précipité. Il y a dans le filtrat extrait par le chloroforme négativité des réactions de LE MITHOUARD et de DERRIEN aussi bien en effectuant la défécation avec parties égales de solutions A, B ou C qu'en laissant un excès d'acétate de zinc.

La réaction de MEYER (52) permet de constater que le dinitrophénol utilisé en pharmacie sous le nom de dinitra n'est pas adsorbé par le colloïde suspensoïde. La réaction d'identification après défécation est extrêmement sensible et peut être poussée jusqu'au 1/400.000.

25 cc. d'urine sont déféqués par 2 cc. 5 de solution A et 5 cc. de solution B.

5 cc. du filtrat sont additionnés de 2 cc. d'acide acétique pur et d'une forte pincée de poudre de zinc. Après 1/4 d'heure d'agitation, filtrer et ajouter II à III g. de bichromate de potassium à 1/1000 : il se produit immédiatement une belle coloration rose.

Pour pratiquer l'extraction du colorant, on peut encore placer le filtrat après défécation dans une ampoule à décanter avec 2 à 3 cc. d'acide acétique. Epuiser trois fois par 15 cc. d'éther. Sécher les liqueurs éthérées sur du chlorure de calcium ; évaporer ; reprendre le résidu par 4 à 5 cc. d'acide acétique au 1/2, ajouter une forte pincée de poudre de zinc. Après dix minutes, filtrer et ajouter II à III g. de bichromate de potassium à 1/1000. Même à l'état de traces, on obtient une belle coloration rose.

Le rubiazol, dont on fait un grand usage comme désinfectant des voies urinaires, est retenu en totalité par le déféquant d'où on peut aisément l'extraire par l'alcool [DANET (53)].

Les barbituriques [DESODT (54)] se retrouvent dans le

filtrat lorsqu'on emploie des doses égales des solutions A et B. M. PAGET et F. TILLY (55) ont indiqué la technique suivante pour effectuer la recherche et l'identification des barbituriques dans l'urine. Cette technique reproduite dans le *Précis de Toxicologie* du Professeur DOURIS (56) est pratiquée couramment dans le laboratoire du Professeur DAUTREBANDE (57) qui l'a fait figurer dans les Travaux Pratiques et Démonstrations de Pharmacodynamie exécutés par les étudiants en médecine de 5^e année.

200 à 500 cc. d'urine selon la concentration du médicament sont déféqués par le 1/10 en volume de solution A et le même volume de solution B. On filtre. On vérifie l'acidité du filtrat et on ajoute au besoin quelques gouttes d'acide acétique.

Dans un grand entonnoir à décantation, on ajoute au filtrat 75 cc. d'éther. On mélange d'abord avec précaution puis vivement pendant quelques minutes. On sépare ensuite la couche éthérée et on épuise encore trois fois la solution aqueuse, chaque fois avec 75 cc. d'éther. On réunit les solutions éthérées, on les dessèche au moyen de sulfate de soude anhydre. On filtre sur bourre d'ouate.

L'éther est ensuite distillé ; le résidu est repris pendant quelques minutes par l'alcool bouillant ; on filtre la solution alcoolique et on l'évapore dans une capsule tarée. Si le résidu est blanc, la pesée donnera la quantité de substance supposée barbiturique de la prise d'essais. Si le résidu est coloré, on le reprend par de l'eau, on le décolore au moyen de charbon activé et la solution est évaporée à sec.

Sur le résidu blanc, on pratique les réactions des dérivés barbituriques.

CONCLUSION

La défécation des liquides biologiques a pour objet l'élimination des substances colloïdales pour obtenir une solution vraie. La technique que nous préconisons après le Professeur PAGET et Mlle DUPONT peut s'opérer en provoquant la formation extemporanée d'un colloïde suspensoïde obtenu par mélange en proportions définies de solutions titrées : solution A de ferrocyanure de potassium à 150 gr. de sel anhydre par litre et solution B d'acétate de zinc à 112 gr. de sel anhydre par litre.

Cette précipitation peut s'effectuer suivant deux modalités : défécation en milieu acide en utilisant des volumes égaux des deux solutions, et défécation en milieu neutre à l'aide d'un volume de solution A et de deux volumes de solution B. Dans ce second mode il reste dans le filtrat un excès d'acétate de zinc venant compléter l'action floculante. Chaque méthode est employée suivant la nature du dosage considéré.

Le liquide résultant de l'action de ce colloïde suspensoïde est complètement déprotéinisé et délipidé. Le filtrat est, par suite, complètement limpide et se prête au dosage des corps non protéiniques. L'opération de défécation présente l'avantage sur d'autres modes de se faire à froid, de ne pas exiger grosse application, et de donner un liquide limpide de premier jet. Lorsque l'excès d'acétate de zinc gêne dans le dosage du constituant envisagé, l'emploi de la technique à pH abaissé permet d'y suppléer.

Nous avons envisagé la plupart des liquides dans lesquels le dosage d'un élément nécessite la disparition d'un état colloïdal. Le dosage du chlore et du glucose sanguins est grandement facilité par l'emploi de cette technique. Les résultats sont identiques aux méthodes de LAUDAT et de BAUDOIN-LEWIN.

La technique est applicable au dosage du sucre protéique suivant la méthode de BIERRY après hydrolyse par la soude.

La lactacidémie peut s'évaluer dans le filtrat. Les résultats sont identiques à ceux obtenus après défécation phosphotungstique.

Le cholestérol est précipité par le réactif, mais grâce à la solubilité de celui-ci dans la soude, on peut reconstituer le complexe initial et y faire l'extraction de ce lipide par le chloroforme selon la méthode de GRIGAUT ou le trichloréthylène suivant la technique modifiée par PAGET et PIERRART (58).

Le dosage de la polypeptidémie selon la méthode du « double azote » préconisée par CRISTOL peut se faire en utilisant cet agent de défécation. La minéralisation des filtrats est beaucoup plus aisée que celle des filtrats phosphotungstiques. La défécation est un peu plus complète que par le réactif phosphotungstique. Certains peptides, entre autres le glycylglycine, passent dans les deux filtrats.

Les méthodes de GOIFFON et SPAEY et de LEFAUX y sont encore applicables pour la mesure de l'index-tyrosine des polypeptides sériques.

Les autres liquides de l'organisme : liquide céphalo-rachidien, liquides gastriques et duodénaux, exsudats et transsudats peuvent être traités comme le sang et dans le filtrat on dose urée, chlorures, glucose...

Le lait qui peut être regardé comme une émulsion est clarifié dans les mêmes conditions par le colloïde suspensioïde. Le dosage du chlore et du glucose peut s'effectuer de la même façon. La matière grasse qui est retenue dans le précipité peut être relarguée par dissolution dans la soude et sur le résultat de la réaction on peut pratiquer une extraction éthérée suivant la méthode de MEILLÈRE.

Le bichromate de potassium qui est ajouté souvent comme agent conservateur des laits est retenu dans le précipité aux doses auxquelles il est habituellement utilisé.

Le ferrocyanure double de potassium et de zinc utilisé comme agent de défécation de l'urine laisse passer les mêmes corps que dans les liquides précédents.

La plus grande partie des phosphates y est précipitée. Le dosage de l'acide urique peut s'y effectuer en opérant la défécation à parties égales, et par différence avec le bloc xantho-urique, on obtient les bases puriques.

Les osazones des glucides peuvent être obtenues plus facilement que par la défécation au réactif de Patein. Le point de fusion est le même et les cristaux obtenus sont tout aussi caractéristiques.

Les corps cétoniques ne sont pas adsorbés et peuvent être dosés par iodométrie.

Le précipité élimine complètement le pus, le sang, l'hémoglobine, les pigments biliaires et l'urobiline. L'indoxyle urinaire passe dans le filtrat d'où on peut l'extraire au chloroforme. Les colorants basiques sont retenus tandis que les colorants acides ne sont pas touchés. Le rubiazol est précipité intégralement, on peut l'extraire ensuite du précipité par l'alcool.

Enfin on peut caractériser dans le filtrat le salicylate de soude, l'antipyrine, le dinitrophénol...

MM. PAGET et TILLY ont mis au point une excellente méthode pour caractériser dans le filtrat par voie microchimique les différents barbituriques, qui ne sont pas retenus dans le précipité si l'on opère la défécation à parties égales.

Le précipité de ferrocyanure double de potassium et de zinc présente donc l'avantage d'être utilisable pour le plus grand nombre des constituants recherchés dans les liquides de l'organisme. Il remplace de nombreux et différents produits. Il est d'un emploi facile et mérite donc d'être vulgarisé.

VU ET APPROUVÉ :

Nancy, le 28 Juin 1939

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

F. KAYSER.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 28 Juin 1939.

Le Recteur de l'Académie,

BRUNTZ,

Président du Conseil de l'Université.

BIBLIOGRAPHIE

- (16) BAUDOIN et LEWIN. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1927, t. 9, p. 280. *Nouvelles méthodes de dosage de petites quantités de sucre.*
- (19) BIERRY. — C.R. Soc. Biol., 1932, t. 110, p. 889. *Sur le sucre protéidique.*
- (20) BIERRY et RATHERY. — *Introduction à la physiologie des sucres. Applications à la pathologie et à la clinique.* Paris, 1935. Baillière, édit.
- (27) BLANCHETIÈRE. — *Les principes immédiats des êtres vivants.* Traité de physiologie des Prs Roger et Binet, p. 378. Masson édit.
- (37) BOIVIN. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1929, t. 11, p. 1269. *Le microdosage du carbone par oxydation sulfochromique et le microdosage de l'azote par destruction sulfurique.*
- (11) CARREZ. — Annales de Chimie Analytique, 1908.
- (49) CONSEIL. — Thèse de pharmacie, Nancy, 1938. *Recherches sur les lactosuries et les petites glycosuries.*
- (8) CRISTOL. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1922, t. 4, p. 267. *Le dosage de l'azote total non protéique du sérum.*
- (28) CRISTOL. — *Précis de Chimie Biologique Médicale,* 1935. Masson, édit.
- (29) CRISTOL. — Thèse, Montpellier, 1926.
- (30) CRISTOL. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1929, t. 11, p. 92. *Nouvelles études sur la désalbumination du sang*

en vue du dosage de l'azote total non protéique et de la détermination de l'indice de polypeptidémie.

- (31) CRISTOL. — Paris Médical, 1933.
- (32) CRISTOL et MOUNIER. — Montpellier Médical, 1937; t. 12, n° 2.
- (7) CRISTOL et PUECH. — Soc. Scient. Méd. et Biol. de Montpellier et du Languedoc, nov. 1925, p. 48. *Peut-on mettre en évidence la présence de polypeptides dans le sang ?*
- (48) DANET. — J.P.C., 1927, t. 6, p. 405. *L'acide urique urinaire.*
- (53) DANET. — Bull. A. S. Biol. Pharm., n° 36, p. 93. *Les urines à Rubiazol.*
- (57) DAUTREBANDE. — T.P. et Démonstrations de Pharmacodynamie, p. 110, 1938. Masson, édit.
- (21) DECONNINCK. — Thèse de pharmacie, Nancy, 1936. *Le phénomène glycolytique.*
- (44) DENIGÈS. — Précis de Chimie Analytique, 1937.
- (51) DENIGÈS. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1935, n° 4, p. 657. *Etude critique et transformation complète de la réaction de Weydel. Application au microdosage colorimétrique de la caféïne.*
- (34) DERRIEN et FONTES. — Chimie Biologique Médicale, p. 203, 1926. Baillière, édit. *Dosage de l'azote total par microkjeldahl.*
- (54) DESODT. — Thèse de pharmacie, Nancy, 1932. *Les barbituriques.*
- (56) DOURIS. — Toxicologie Moderne, 1935. Vigot Frères, édit.

- (3) DUMAZERT. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1935, t. 17, p. 1163. *Déprotéinisation par l'hydrate de cadmium.*
- (28) FIESSINGER, OLIVIER et HERBAIN. — Les diagnostics biologiques. Maloine, 4^e édition, 1938, p. 498. *Dosage des polypeptides par la méthode du double azote.*
- (22) FLEURY. — *Fiches techniques de Chimie Biologique.*
- (42) FLEURY et MARQUE. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1930, n° 1, p. 58. *Dosage des sucres réducteurs par les liqueurs mercurico-alcalines.*
- (6) FOLIN. — Journal of Biol. Chem., 1919, t. 38, p. 81 ; 1920, t. 41, p. 367.
- (38) GOIFFON et SPAEY. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1934, p. 1675. *Mesure de l'index tyrosine des polypeptides sériques.*
- (39) GOIFFON et SPAEY. — C. R. Soc. Biol., 1934, p. 711, *Méthode colorimétrique de mesure des polypeptides du sérum.*
- (50) GUIART et GRIMBERT. — *Diagnostic chimique*, 1922. Lamarre, édit., p. 902.
- (2) HADEGORN et JANSEN.
- (4) LAUDAT. — C. R. Soc. Biol., 1929, p. 701. *Etude de la chlorémie plasmatique et globulaire chez l'homme normal.*
- (40) LEFAUX. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1935, t. 17, p. 1821. *Nouvelle mesure de l'index tyrosine des polypeptides sériques.*
- (13) LÉVY. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1929, n° 5, p. 633. *Note sur le dosage du chlore dans le sérum sanguin et les globules rouges.*

- (35) MARTENS. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1936, t. 11, p. 1551.
Le double azote.
- (36) MARTENS. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1928, t. 10, p. 1336.
Contribution à l'étude de l'azote peptidique dans le sang.
- (52) MEYER et DRUTEL. — Bull. A. S. Biol. Pharm., n° 33,
p. 184. *Sur la recherche du dinitrophénol et de ses produits d'élimination dans l'urine.*
- (5) MOOG.
- (12) PAGET. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1937, t. 19, p. 787.
A propos de la détermination et de la valeur du rapport chloré érythroplasmatique.
- (24) PAGET. — Bull. A. S. Biol. Pharm., 1936, n° 33,
p. 198. *Les polypeptides du sang.*
- (25) PAGET. — Journal de Médecine de Lille, mai 1932,
p. 337. *Les constituants azotés du sérum.*
- (41) PAGET. — Revue d'Obstétrique, Janvier 1932, n° 1,
p. 7. *Le Lait.*
- (9) PAGET et DUPONT. — C. R. Soc. Biol., 1934, t. 117,
p. 22. *Sur l'emploi d'un nouvel agent de défécation des liquides biologiques.*
- (17) PAGET et DUPONT. — C. R. Soc. Biol., 1934, t. 117,
p. 881. *Application au dosage de la glycémie.*
- (43) PAGET et DUPONT. — C. R. Soc. Biol., 1935, t. 128,
p. 1536. *Applications au dosage du lactose.*
- (23) PAGET et GUYADER. — Bull. A. S. Biol. Pharm., 1937,
n° 37, p. 176. *Applications au dosage du cholestérol.*
- (33) PAGET et GUYADER. — C. R. Soc. Biol., 1936, t. 121,

- p. 1105. *La défécation ferrocyno-zincique et les constituants azotés du plasma.*
- (14) PAGET et KOREJWO. — Bull. A. S. Biol. Pharm., 1936, n° 35, p. 600. *Détermination du rapport chloré érythroplasmatique.*
- (58) PAGET et PIERRAAT. — C. R. Soc. Biol., Lille, Avril 1937.
- (1) PATEIN et DUFAU. — J. P. C., 1899, t. 2, p. 433 et t. 1, p. 221.
- (47) RONCHÈSE. — J. P. C., 1906, t. 23, p. 336. *L'acide urique urinaire.*
- (45) SORENSEN-MESTREZAT. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1914-1919, t. 1, p. 107. *L'azote amino-ammoniacal.*
- (46) THIERRY. — J. P. C., 1921, t. 1, p. 494. *Dosage différentiel de l'acide urique et des bases puriques.*
- (10) THOMAS. — Cours de Biochimie. Masson, édit. *Lois de Loeb.*
- (55) TILLY. — Thèse de pharmacie, Nancy, 1937. *Les barbituriques.*
- (15) VLADESCO. — C. R. Soc. Biol., 1935, t. 119, p. 768. *Un défécant nouveau et ses applications en biochimie.*
- (18) VLADESCO. — C. R. Soc. Biol., 1935, t. 120, p. 665. *Sur la défécation du sang et de l'urine par le ferrocynure de cuivre.*

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

<i>La défécation des liquides biologiques</i>	5
---	---

CHAPITRE PREMIER

<i>La défécation ferrocyan-zincique selon la technique</i> PAGET-DUPONT-GUYADER	9
--	---

CHAPITRE DEUXIEME

<i>La défécation du sang</i>	15
I. — Action du déféquant sur les constituants minéraux	17
II. — Action du déféquant sur les constituants organiques	22
A. — Composants organiques non azotés	22
B. — Composants organiques azotés	32

CHAPITRE TROISIEME

I. — Le liquide céphalo-rachidien	49
II. — Liquides gastriques et duodénaux	51
III. — Exsudats et transsudats	53

CHAPITRE QUATRIEME

<i>Le Lait</i>	55
--------------------------	----

CHAPITRE CINQUIEME

<i>L'urine</i>	63
CONCLUSION	73

